

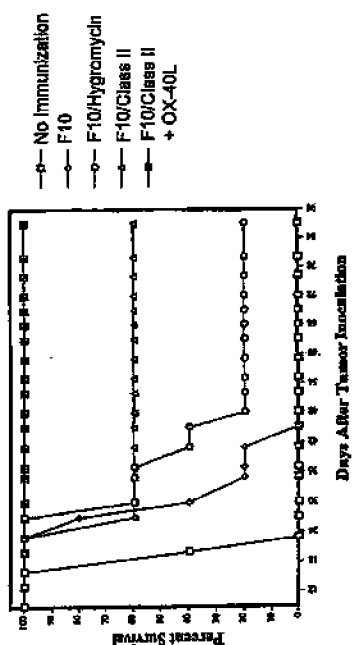
INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6 : C12N 15/12, A61K 39/395, 38/16, 48/00 A1  
(11) International Publication Number: WO 99/42585  
(43) International Publication Date: 26 August 1999 (26.08.99)

(21) International Application Number: PCT/US99/03908  
(22) International Filing Date: 23 February 1999 (23.02.99)  
(30) Priority Date: 24 February 1998 (24.02.98) US 08/028,716  
(71) Applicant: SISTERS OF PROVIDENCE IN OREGON [US]; Providence Portland Medical Center, 4805 N.E. Gleason Street, Portland, OR 97213 (US)  
(72) Inventor: WENDBERG, Andrew D.; 3266 S.W. Palmcourt Boulevard, Portland, OR 97201 (US)  
(74) Agent: BARR, David J.; Kinsquits, Speciman, Campbell, Leigh & Wainston, LLP, One World Trade Center, Suite 1600, 121 S.W. Salmon Street, Portland, OR 97204 (US)

Published  
With International search report.  
Before the expiration of the time limit for entering the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.

(54) TITLES COMPOSITIONS CONTAINING AN OX-40 RECEPTOR BINDING AGENT OR A NUCLEIC ACID ENCODING THE SAME AND METHODS FOR ENHANCING ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE



(57) Abstract

Compositions and methods for enhancing the immune response of a mammal to an antigen by engaging the OX-40 receptor on the surface of T-cells are disclosed, comprising administering to the mammal a composition comprising a purified OX-40 receptor binding agent and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said composition is administered to the mammal such that the OX-40 receptor binding agent is presented to T-cells of the mammal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen. Such compositions and methods can be used in immunization and cancer treatment.

\* (Revised in PCT Gazette No. 44/1999, Section II)

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LU	Luxembourg	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LV	Latvia	SK	Slovakia
AO	Angola	FR	France	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
AU	Australia	GB	United Kingdom	LT	Lithuania	SR	Serbia
AZ	Azerbaijan	GE	Georgia	MD	Moldova	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GR	Greece	MG	Madagascar	TO	Togo
BB	Barbados	HN	Honduras	ML	Mali	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	IE	Ireland	MO	Macao	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	IL	Israel	MT	Malta	TR	Turkey
BG	Bulgaria	IT	Italy	MR	Morocco	TT	Trinidad and Tobago
BI	Burundi	JP	Japan	MX	Mexico	UA	Ukraine
BJ	Benin	KE	Kenya	MY	Malaysia	UG	Uganda
BK	Bhutan	KG	Kyrgyzstan	NI	Nicaragua	US	United States of America
BL	Barbados	KZ	Kazakhstan	NP	Nepal	UY	Uruguay
BM	Bermuda	LA	Laos	NZ	New Zealand	VE	Venezuela
BN	Brunei Darussalam	LC	Liechtenstein	PE	Peru	YU	Yugoslavia
BO	Bolivia	NE	Niger	PG	Papua New Guinea	ZA	South Africa
BR	Brazil	NG	Nigeria	PH	Philippines		
BS	Bahamas	NO	Norway	PK	Pakistan		
BT	Bhutan	OM	Oman	PL	Poland		
BZ	Belize	PA	Panama	PT	Portugal		
		PE	Peru	RO	Romania		
		PG	Papua New Guinea	RS	Russia		
		PH	Philippines	RU	Russian Federation		
		PK	Pakistan	SD	Sudan		
		PL	Poland	SE	Sweden		
		PT	Portugal	SG	Singapore		
		RO	Romania				
		RU	Russian Federation				
		SD	Sudan				
		SE	Sweden				
		SG	Singapore				

# COMPOSITIONS CONTAINING AN OX-40 RECEPTOR BINDING AGENT OR A NUCLEIC ACID ENCODING THE SAME AND METHODS FOR ENHANCING ANTIGEN-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE

## Field of the Invention

This invention relates to methods and compositions for generating enhanced immune responses in animals, particularly in human and non-human mammals. The invention also relates to production of compositions and materials for use in the methods, for example to related vaccines, cells, plasmids, viral and other vectors, and preparations derived therefrom. Other aspects of the invention will be apparent from the following description.

## Background of the Invention

It is known that many receptor-ligand interactions are involved in the induction, establishment and modulation of immune responses directed against antigens. At least two signals are necessary to activate a CD4 or CD8 T-cell response to antigen (Lenschow et al., 1996). The first signal is delivered through the T-cell receptor (TCR) by an antigen (typically a peptide) bound to a major histocompatibility (MHC) class I or II molecule present on the surface of an antigen presenting cell (APC). The second signal involves the binding of a ligand present on the surface of the APC to a second receptor molecule on the surface of the T-cell. This second signal is termed co-stimulation, and the APC ligand is often referred to as a co-stimulatory molecule. The best characterized second signal is delivered via an interaction between the CD28 receptor on the T-cell, and its ligands B7.1 or B7.2 on the APC, although a number of other examples of receptor/co-stimulatory molecule interactions have been described.

In combination, the two signals activate the T-cell, which in turn secretes cytokines and proliferates. In the case of CD4 T-cells, the activated cells (designated CD4<sup>+</sup>) produce cytokines, including IL-2 and IFN $\gamma$ , which activate killer (CD8<sup>+</sup>) T-cells at the site of inflammation. Once CD4 T-cells are activated, another receptor, CTLA-4 is expressed, which is homologous to CD28 and binds B7 molecules with a higher affinity than CD28. The B7/CTLA-4 interaction inhibits the activation signal of CD28 and delivers a negative signal that may down-regulate T-cell responses (Krummel et al., 1996; Walunas et al., 1996). This down-regulation mechanism may serve to prevent excessive immune system responses, for example by decreasing the amount of cytokines produced during an inflammatory event. Concurrently, however, it may also down-regulate the number of T-cells that go on to become "memory cells". Reducing the number of memory cells means that fewer such cells will be available to respond to the same antigen the next time it is encountered. However, there are a number of situations where it would be advantageous to maintain, rather than down-regulate, an active T-cell

responses. Cancer patients, for example, would benefit from maintaining an active T-cell response against tumor cells. The concept of vaccination requires that a population of memory T-cells which recognized the administered antigen be maintained.

Another receptor/ligand combination that has been proposed to play a role in co-stimulation of CD4 T-cells is the OX-40 receptor/OX-40 ligand pairing. While the CD28 receptor is present on the surface of many sub-classes of T-cells (irrespective of whether they are activated or not), the OX-40 receptor (OX-40<sup>+</sup>) (Paterson et al. 1987; Calderhead et al., 1993) has been shown to be present only on antigen activated CD4<sup>+</sup> T-cells *in vivo* (Weinberg et al., 1994; 1996). Thus, it has been shown that OX-40 is present on activated CD4<sup>+</sup> T-cells that recognize autoantigen at the site of inflammation in autoimmune disease, but not in the peripheral blood system (Weinberg et al. 1994; 1996). OX-40 has also been shown to be present on the surface a percentage of CD4<sup>+</sup> T-cells isolated from tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells removed from patients with squamous cell tumors of the head and neck and melanomas (Vetto et al., 1997). The OX-40 ligand, a member of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily, has been shown to co-stimulate T-cells which have been activated with an anti-CD-3 antibody (i.e., in a nonantigen-specific manner) (Godfrey et al., 1994). Beyond its general co-stimulatory function however, the biological role of the OX-40

receptor/OX-40 ligand interaction in the immune response pathway is, to date, unknown.

## Summary of the Invention

This invention provides in certain of its aspects compositions and methods which can be used to enhance and maintain the immune response of a mammal towards a chosen antigen. While prior procedures have attempted to boost the immune response generally, compositions and methods disclosed herein are specifically targeted to T-cells which have recently been activated in response to a particular antigen (so-called "memory cells") or T-cells which are in the process of such priming. In particular, the effects of the methods disclosed herein are believed to include increasing the number of memory T-cells, thereby enhancing the response of the immune system to a specific (chosen) antigen.

Underlying the invention are findings (1) that engagement of the OX-40 receptor on CD4<sup>+</sup> T-cells especially for example during, or shortly after, priming of such cells by antigen, can result in an increased response of the CD4<sup>+</sup> T-cells to that antigen and (2) that the elevated response to that antigen can be maintained for a period of time substantially longer than in the absence of such an engagement. As a result, increasing the immune response by providing molecules which engage the OX-40 receptor, e.g. during T-cell priming, can markedly increase the resistance of an animal to disease, by

bearing T-cell recognition of antigens presented by infectious agents, such as bacteria and viruses, as well as tumor cells.

Accordingly, the present invention provides among other things the use of an OX-40 receptor binding agent, or of a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent, in the manufacture of a pharmaceutical composition for enhancing immune responses against an antigen in a mammal, which is either a tumour antigen, or an antigen for which the composition is administered so as to present the OX-40 receptor binding agent to T-cells of the mammal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen.

The OX-40 receptor binding agent can be selected from OX-40L, anti-OX-40 antibodies (e.g. a monoclonal antibody such as a humanized monoclonal antibody), and immunologically effective portions of anti-OX-40 antibodies.

The antigen can be selected from viral antigens, bacterial antigens and tumor antigens.

Also according to the invention, a purified OX-40 receptor binding agent and a pharmaceutically acceptable carrier can be used in the manufacture of a pharmaceutical composition for enhancing the immune responses of a mammal to an antigen by administering the composition to the mammal to present the OX-40 receptor binding agent to T-cells of the mammal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen, e.g. about 3-7 days after administration of the antigen.

The technique can be applied to enhancing the immune response of a mammal to a tumour cell in the mammal.

One form in which the invention can be carried out is by the use of a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of a cell (e.g. by possessing a suitable transmembrane sequence), in the manufacture of a composition for introducing the nucleic acid into a cell and enhancing the immunogenicity of the cell, e.g. a tumor cell.

The nucleic acid can if desired further encode a second protein, e.g. one selected from major histocompatibility complex proteins, cytokines, interferons and immune-system co-stimulatory molecules.

The nucleic acid encoding the OX-40 receptor binding agent can be made part of a viral or plasmid vector, e.g. a viral vector based on an adenovirus, retrovirus or herpesvirus. The viral vector can be an attenuated or disabled virus.

According to a further aspect of the invention a nucleic acid which encodes an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of a cell, along with tumor cells from a mammal, can be used in the manufacture of a pharmaceutical composition for stimulating the immune response of a mammal to a tumor in the mammal by (a)

removing tumor cells from the mammal; (b) attenuating the removed tumor cells; (c) introducing the nucleic acid into the attenuated tumor cells; and (d) administering the thus-treated attenuated tumor cells containing the nucleic acid molecule to the mammal. The OX-40 receptor binding agent in this aspect can be OX-40L. The tumor cells can be attenuated prior to or after introducing the nucleic acid molecule.

In an alternative manner of carrying out the invention, a nucleic acid which encodes an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of a cell can be used, along with T-cells from a mammal, in the manufacture of a pharmaceutical composition for enhancing the immune response of a mammal to an antigen, by removing T-cells from the mammal, incubating the removed T-cells *ex vivo* with an OX-40 receptor binding agent, and returning the thus-treated T-cells to the mammal. Again, the mammal may have a tumor, and the antigen can be a tumor antigen.

More generally, an OX-40 receptor binding agent or a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent can be used in the manufacture of a pharmaceutical for enhancing immune response against a tumor in a mammal by increasing the amount of OX-40 receptor binding agent at the tumor site.

The invention in other aspects also provides *inter alia* tumor cells that have been transformed with a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of the cell, and compositions comprising cell membranes isolated from such cells.

The invention further provides compositions with the features and for the purposes set forth herein, and methods of making and using those compositions.

In one example of the invention, made for comparison with administration of certain tumor cells to animals which alone result in 100% lethality, administration of molecules which engage the OX-40 receptor along with the tumor cells protected the animals from the tumor cells.

Without intent to be bound by theory, one possible explanation of the mechanism underlying this discovery is depicted in Fig. 1 of the accompanying drawings. Figure 1 schematically illustrates the role of CD4 T-cells in the immune system. Naïve T-cells (i.e., those not previously exposed to antigen) in the spleen or lymph nodes differentiate into activated cells ("effectors") in response to antigen. As discussed above, the activation requires presentation of antigen in the context of an MHC molecule, together with a co-stimulatory molecule. Co-stimulatory molecules characterized to date, such as the B7 molecule, are believed to act at the naïve/effector cell transition. After activation, a substantial subset of these effector cells is proposed to produce cytokines and, through a feed-back mechanism which may involve certain T-cell receptor/ligand interactions (e.g., CTLA-4/B7), subsequently undergoes programmed cell death. The remaining

subset of T-cells expands and goes on to become memory cells, ready to respond to future exposures to the antigen. It is believed that co-stimulation of T-cells by engagement of the OX-40 receptor during this period can increase effector T-cell function and also increase the proportion of antigen-specific activated CD4<sup>+</sup> T-cells which remain after the initial antigen exposure and which eventually adopt a memory phenotype.

Thus, it is proposed that, in contrast to conventional co-stimulatory molecules which act at the naive/effector cell transition, OX-40 ligands act at the effector/memory cell transition. Therefore, the methods of the present invention, which involve engagement of the OX-40 receptor, serve to increase the proportion of effector cells which go on to become memory cells. By increasing this population of cells, the present and future ability of the immune system to respond to that specific antigen is enhanced and this enhanced response capability is maintained for a significantly longer period of time. In contrast, previously described methods of enhancing the immune response by providing co-stimulatory molecules make use of co-stimulatory molecules, such as B7, which act at the naive/effector cell transition (see, for example, European Patent Application EP 0 733 373 (Bristol Myers Squibb; L. Chen et al; Compositions and methods for increasing the immunogenicity of tumor cells by administration of B7 and CD2-transfected cells)). It is believed that enhancement of the population of antigen-specific memory cells has not heretofore been disclosed, but rather enhancement of an initial immune response.

Methods for enhancing the immune response as described here are believed to be able to produce good enhancement of the immune response by boosting the population of antigen-specific memory T-cells.

It is emphasized that this is only one possible explanation for the invention disclosed and claimed herein; regardless of the actual mechanism, the administration of molecules which engage the OX-40 receptor during antigen activation is provided hereby and can confer significant immunological benefit.

Molecules which can engage the OX-40 receptor are herein referred to as OX-40 receptor binding agents.

Thus, in one aspect the present invention provides a method for inducing or enhancing an immune response mediated by CD4<sup>+</sup> T-cells against an antigen, which comprises delivering to CD4<sup>+</sup> T-cells during, or shortly after, antigen priming has occurred *in vivo*, an OX-40 receptor binding agent. Compositions for use in such a method which comprise an OX-40 receptor binding agent and a suitable carrier are also provided.

OX-40 receptor binding agents useful in the present invention include the OX-40 ligand, functional domains of the OX-40 ligand, such as the extracellular domain, either

alone or conjugated to other peptide domains, e.g. as fusion proteins, and antibodies with anti-OX-40 receptor specificity.

Such OX-40 receptor binding agents can be used to induce or enhance a CD4<sup>+</sup> T-cell mediated immune response against a wide variety of antigens, including viral antigens, bacterial antigens and tumor antigens. In one aspect of the invention, OX-40 receptor binding agents can be used to enhance the immune response of an animal to an antigen.

Thus, the present invention further provides a method of enhancing the immune response of an animal to an antigen, comprising administering to the animal a composition comprising a purified OX-40 receptor binding agent and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said composition is administered to the animal such that the OX-40 receptor binding agent is presented to T-cells of the animal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen. The process of T-cell priming by an antigen in mammals is considered to take place within about 3-7 days following delivery of antigen. "Shortly after priming" thus generally refers to a time period of about 3-10 days following administration of antigen.

According to a further aspect of the present invention, the OX-40 receptor binding agent can be administered to a mammal for example up to approximately 10 days after, more typically about a week after, and preferably about 3-7 days after, administration of an antigen preparation in order to enhance the CD4<sup>+</sup> T-cell mediated immune response of the mammal against the administered antigen. The exact timing is believed often not to be critical.

The present invention also provides methods for enhancing the immune response of a mammal to a tumor. In one such method, the immune response of a mammal to a tumor is stimulated by administering to the mammal a therapeutically effective dose of a purified OX-40 receptor binding agent.

Vaccine compositions encompassed by the invention include one or more antigens and a therapeutically effective amount of an OX-40 receptor binding agent. As noted above, the antigen may be selected from the group consisting of tumor antigens, bacterial antigens and viral antigens. Where the vaccine includes a viral antigen and where the viral antigen is delivered by means of an attenuated or replication-defective virus, the OX-40 receptor binding agent may be provided by means of a nucleic acid molecule encoding the agent inserted into the viral genome, such that it is expressed in the cells of the mammal to which the vaccine is delivered. Where the vaccine includes a bacterial antigen delivered by means of an attenuated bacterium or a preparation of bacterial antigens, the OX-40 receptor binding agent may be provided by means of a nucleic acid molecule encoding the agent, which nucleic acid molecule is contained and

expressed within the bacterial cell. Similarly, where the vaccine includes a tumor antigen preparation, such as tumor cell membranes, the OX-40 receptor binding agent may be provided by means of a nucleic acid molecule encoding the agent, which nucleic acid molecule is expressed within the tumor cell prior to disruption of the cell for vaccine preparation. The antigen and a material providing an OX40 receptor binding agent can be delivered to the animal either separately or together; the period of time referred to as shortly after priming refers to physiologically effective contact, which may occur after physical administration especially where what is administered is a composition that indirectly provides the OX40 receptor binding agent *in vivo*, e.g. the nucleic acid mentioned above.

A further aspect of the invention is the provision or enhancement of OX-40 receptor binding agent expression in cell, such as an antigen presenting cell (APC), e.g., a tumor cell. Expression of OX-40 receptor binding agent in an APC may be achieved by delivering into the cell a vector carrying a nucleic acid sequence encoding the agent, wherein expression of the nucleic acid sequence results in levels of expression of the agent that are higher than those in a comparable cell lacking the vector. Suitable vectors for delivering and expressing the OX-40 receptor binding agent are well known in the art and include plasmid vectors and viral vectors, such as adenovirus, herpesvirus and retrovirus vectors. In certain embodiments, the vector may carry one or more additional nucleic acid sequences which encode antigens against which an immune response is desired. Thus, one aspect of the invention is a method for enhancing the immunogenicity of a cell, the method comprising introducing into the cell a nucleic acid molecule encoding an OX-40 receptor binding agent, such that the OX-40 receptor binding agent is expressed on the surface of the cell.

In another aspect of the invention, the APC may be a tumor cell removed from a mammalian subject. In this respect, the invention is useful for enhancing a mammal's immune response against tumor cells present in its body. In one embodiment of the invention, tumor cells are removed from a mammal. A vector expressing the OX-40 receptor binding agent is then introduced into the removed cells, which are then returned to the mammal. Preferably, the tumor cells are attenuated prior to re-introduction to the patient; mechanisms for attenuating tumor cells are well known and include, for example, irradiation. The result of this procedure is that the re-introduced attenuated tumor cells simultaneously present both tumor antigens and the OX-40 receptor binding agent to CD4<sup>+</sup> T-cells, resulting in an elevated CD4<sup>+</sup> T-cell mediated immune response against tumor cells in the body of the mammal. Since certain tumor cells evade the body's immune system by down-regulating expression of antigen-presenting MHC molecules, it may be advantageous to introduce into the removed tumor cells not only a vector which

expresses the OX-40 receptor binding agent, but also a vector which expresses an MHC molecule, preferably an MHC class II molecule. In certain embodiments of the invention, a single vector which expresses both the OX-40 receptor binding agent and the MHC molecule may be introduced into the tumor cells. Thus, in another aspect of the

invention, a method for stimulating the immune response of a mammal to a tumor in the mammal is provided, wherein the method comprises: (a) removing tumor cells from the mammal; (b) attenuating the removed tumor cells; (c) introducing into the attenuated tumor cells a nucleic acid molecule which encodes an OX-40 receptor binding agent such that the OX-40 receptor binding agent is expressed on the surface of the attenuated tumor cells; and (d) administering a therapeutically effective dose of a preparation of the attenuated tumor cells containing the nucleic acid molecule to the mammal.

The present invention also provides novel methods of adoptive immunotherapy in which the immune response of a mammal to an antigen is enhanced by removing T-cells from the mammal, incubating the removed T-cells *ex vivo* with an OX-40 receptor binding agent, and returning the T-cells to the mammal. Such a method may be particularly beneficial for the treatment of cancer patients. The invention also provides a method for enhancing the immune response of an animal against a tumor, comprising increasing the amount of an OX-40 receptor binding agent at the tumor site (i.e., the area of the body including and immediately adjacent to the tumor). Increasing the amount of OX-40 receptor binding agent may be achieved by administering to the tumor site a composition selected from the group consisting of OX-40 receptor binding agents and nucleic acid molecules encoding OX-40 receptor binding agents.

The invention is further described by way of example but not with intent to limit the scope of the invention thereby, in the description, figures of the accompanying drawings, and examples set forth below.

#### Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic representation of a proposed mechanism of immune system CD4<sup>+</sup> T-cell activation and response.

Figure 2 is a graph showing the effect of engaging the OX-40 receptor on T-cell proliferation *in vitro*.

Figure 3 is a graph showing a comparison of the levels of IL-2 produced by T-cells reconstituted with APCs expressing either MHC class II alone, MHC class II plus B7.1 or MHC class II plus OX-40 ligand.

Figure 4 is a graph illustrating the protective effect of administering OX-40 receptor binding agent to mice inoculated with tumor cells.

Figure 5 is a graph showing the protective effect of adoptive transfer of splenocytes from mice inoculated with OX-40 receptor binding agent and tumor cells into naive mice subsequently challenged with tumor cells.

Figure 6 is a graph showing the protective effect of administering an OX-40 receptor binding agent to mice inoculated with in vivo passaged tumor cells.

Figure 7 is a graph showing that the protective effect of the OX-40 receptor binding agent against in vivo passaged tumor cells is dependent on the dose of OX-40 receptor binding agent administered.

Figure 8 is a graph showing the protective effect of vaccinating mice with irradiated tumor cells expressing OX-40 receptor binding agent and MHC class II.

Figure 9 shows photomicrographs of breast cancer biopsies from two patients with staining to show localization of lymphocytes and OX40R<sup>+</sup> cells, relevant to treatment of such cancers by methods described herein.

Figures 10-14 are graphs showing survival of animals in the experiments of Examples 6-9 below.

## Detailed Description

### 1. Definitions

To facilitate review and understanding of the invention as described herein, the following definitions of terms are provided:

OX-40 receptor: a protein (also variously termed ACT-4 and ACT36) expressed on the surface of antigen-activated mammalian CD4<sup>+</sup> T-cells (Weirberg et al., 1984, 1998; WO 95/12673 (Stanford Univ & Becton Dickinson; W Godfrey et al; Latza et al., 1994). DNA sequences encoding mouse, rat and human OX-40 receptor homologs have been cloned and sequenced (Malet et al., 1990; Calderhead et al., 1993; Latza et al., 1994; WO 95/12673 (supra)).

OX-40 ligand: a protein (also variously termed gp34 and ACT-4-L) expressed on the surface of certain mammalian cells (such as antigen presenting cells ("APCs") which specifically interacts with the OX-40 receptor (the protein as such but not its function was described in Miura et al., 1991; WO 95/21915 (Stanford Univ; Godfrey et al) identified the human protein and its function, using the designation ACT-4-L; and U.S. Patent No. 5,457,035 (Immunex; PA Baum et al.) described a murine protein of corresponding function). Genes encoding the OX-40 ligands from mouse and human have been cloned and sequenced (U.S. Patent No. 5,457,035 (supra); Miura et al., 1991; Godfrey et al., 1994). The OX-40 ligand includes intracellular, transmembrane and extracellular domains; a functionally active soluble form of OX-40 ligand ("soluble OX-40 ligand") may be produced by deleting the intracellular and transmembrane

domains as described in U.S. Patent No. 5,457,035 and WO 95/21915. A functionally active form of OX-40 ligand is a form that retains the capacity to bind specifically to the OX-40 receptor; methods of determining the ability of an OX-40 ligand molecule or derivative to bind specifically to the OX-40 receptor are discussed below. Methods of making and using the OX-40 ligand and its derivatives are described in WO 95/21915 (supra), which also describes proteins comprising the soluble form of OX-40 ligand linked to other peptides, such as human Ig Fc regions, that can be produced to facilitate purification of OX-40 ligand from cultured cells, or to enhance the stability of the molecule after in vivo administration to a mammal (see also U.S. Patent No. 5,457,035).

As used herein, the term "OX-40L" includes the entire OX-40 ligand, soluble OX-40 ligand, and fusion proteins comprising a functionally active portion of OX-40 ligand covalently linked to a second protein domain. Also included within the definition of OX-40L are OX-40 ligand variants which vary in amino acid sequence from naturally occurring OX-40 ligand molecules but which retain the ability to specifically bind to the OX-40 receptor. Such variants are described in U.S. Patent No. 5,457,035 and WO 95/21915 (supra).

OX-40 receptor binding agent: an agent which binds substantially only to an OX-40 antigen present on the surface of antigen activated mammalian T-cells, such as activated CD4<sup>+</sup> T-cells. As used herein, the term "OX-40 receptor binding agent" includes anti-OX-40 antibodies and OX-40L.

The term "anti-OX 40 antibodies" encompasses monoclonal and polyclonal antibodies which are specific for OX-40, i.e., which bind substantially only to OX-40 when assayed using the methods described below, as well as immunologically effective portions ("fragments") thereof. Preferably, the anti-OX-40 antibodies used in the present invention are monoclonal antibodies (or immunologically effective portions thereof) and preferably humanized monoclonal antibodies (or immunologically effective portions thereof). Immunologically effective portions of monoclonal antibodies include Fab, Fab', Fab'2, Fabc and Fv portions (for a review, see Batler and Horowitz, 1989). In the present invention, immunologically effective portions of monoclonal antibodies are preferably portions including a heavy chain domain. Humanized forms of anti-OX-40 monoclonal antibodies and immunologically effective portions of anti-OX-40 antibodies are described in WO 95/12673 and WO 95/21915 (supra), along with methods which may be employed to produce such antibodies. Anti-OX-40 antibodies may also be produced using standard procedures described in a number of texts, including

"Antibodies, A Laboratory Manual" by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Methods of making humanized monoclonal antibodies are well known, and include for example those described in U.S. Patent Nos. 5,585,089 (Protein Design: CL Queen et al.; "Humanized Immunoglobulins"), 5,565,332 ("Production of Chimeric Antibodies-A Combinatorial Approach"), 5,225,539 (Med Res Council: GP Winter; "Recombinant Altered Antibodies And Methods Of Making Altered Antibodies"), 5,693,761-762 (Protein Design: CL Queen et al.; "Polynucleotides Encoding Improved Humanized Immunoglobulins", and "Humanized Immunoglobulins"), and 5,530,101 (Protein Design: CL Queen et al.; "Humanized Immunoglobulins"), and references cited therein.

Similarly, methods of making and using immunologically effective portions of monoclonal antibodies, also referred to as antibody fragments, are well known and include for example those described in Better and Horowitz (1989) ("Expression of Engineered Antibodies and Antibody Fragments in Microorganisms"); Better et al. (1990) ("Production and Scale-Up of Chimeric Fab Fragments from Bacteria"); Glockshuber et al. (1990) ("A Comparison of Strategies to Stabilize Immunoglobulin F<sub>2</sub> Fragments"); and U.S. Patent Nos. 5,648,237 (Genentech: PJ Carter; "Expression of Functional Antibody Fragments"), 4,946,778 (Genex: RC Ladner et al.; "Single Polypeptide Chain Binding Molecules"), and 5,455,030 (Enzon: RC Ladner et al.; "Immunotherapy Using Single Chain Polypeptide Binding Molecules"), and references cited therein.

Various formulations of OX-40L may be used as OX-40 receptor binding agents in the present invention, including the entire OX-40L molecule, soluble OX-40L, and fusion proteins in which, for example, the extracellular domain of OX-40L is covalently linked to a second protein domain. The second protein domain may serve a number of functions, including enhancing the activity of OX-40L, facilitating purification, or increasing the stability of the protein in the body. In such fusion proteins, OX-40L, preferably as an extracellular domain or other active fragment thereof or the mutin of such a domain or fragment, is fused with a suitably chosen protein such as a blood protein or fragment thereof corresponding to suitably chosen blood proteins of the subject to be treated. The specific example described below involves a fusion between OX-40L extracellular domain and a polypeptide representing a constant domain of human IgG, particularly the CH2 and CH3 domains of IgG. Preferably such fusions will include a hinge amino acid sequence region corresponding to a hinge region of the IgG in which preferably any cysteine residues have been mutated to non-cysteine amino acid residues, such as alanine or glycine. It is preferred to have the N-terminal of the OX-40L partial sequence follow on in the fusion protein from the C-terminal of the IgG partial sequence, optionally with a spacer sequence intervening. But the opposite arrangement can also be useful and is also encompassed within the scope of the invention. An alternative

example of a fusion partner involves use of domains 3 and 4 of the CD4 sequence in place of the CH2 and CH3 regions of IgG. Such fusion proteins can be made in any suitable heterologous expression system, and, where appropriate, the DNA encoding the fusion protein can also encode a known secretory signal sequence suitable for the host cell system employed so that the DNA is translated into a protein that at first includes the secretory signal and the cleavage sequence but is then transported out of the cell without such ancillary sequences.

An example of a recombinant form of OX-40L is OX-40L:huFolG6 in which the extracellular domain of OX-40L is fused to the heavy chain of human IgG. The production of such fusion proteins is described in U.S. Patent No. 5,467,035. By way of example, the OX-40L:huFolG6 fusion used in the experiments described below was produced as follows. The fusion protein OX-40L:huFolG6 was expressed in the well-known CHO cell expression system, using G418 selection and the known pCEM-T cloning vector system. A leader sequence comprising a secretory signal appropriate to the CHO cell expression system was constructed using synthetic oligonucleotides, and annealed and ligated to form an approximately 80 bp fragment. Following assembly, the DNA was excised from an agarose gel and amplified in a PCR reaction using specific primers to generate HindIII and XhoI sites at the termini. The leader was then cloned into the pCEM-T cloning vector to form a product vector comprising the leader sequence.

The leader sequence further included bases to encode 7 amino acid residues derived from the antibody heavy chain sequence to provide a site for cleavage of the signal peptide. A sub-sequence from a human IgG1 gene (cDNA) comprising hinge, CH2 and CH3 domains was PCR-cloned with the introduction of XhoI and PstI sites at the 5' and 3' ends respectively, to allow ligation to the leader and human OX-40L sequences. Following cloning into pGEM-T, a XhoI - PstI fragment was isolated, and ligated into the vector comprising the leader sequence as mentioned above (after that vector had been digested with XhoI and PstI), to form a further result vector comprising leader sequence and hinge-CH2-CH3 regions. The extracellular domain of the human OX-40L gene was PCR cloned with the introduction of PstI and HindIII sites at the 5' and 3' ends respectively, and ligated into the cloning vector pGEM-T. Clones of the correct orientation were selected, so that digestion with PstI alone led to the release of a gene fragment containing OX-40L and polylinker sequence at the 3' terminus. This fragment was then ligated into the PstI site of the previous result vector, thereby forming a vector encoding the wanted leader-IgG-OX-40L fusion construct. The gene construct was then isolated as a HindIII fragment and transferred to an expression vector containing a hCMV promoter to drive expression, and a neoR selectable marker. Clones were screened for inserts in the correct orientation, and then grown up for transfection. The construct was used to

transfect CHO cells, and positive CHO clones were selected using G418; fusion protein secretion was detected by incubation of supernatants with OX40-transfected Sp2/0 myeloma cells and detection of binding by flow cytometric analysis. High level secreting cells were bulked up and fusion protein from the supernatant purified on a protein G-Sepharose column. Eluted material was run on a SDS-PAGE (12%) gel and the gel stained with Coomassie blue to confirm purity. For human OX-40 sequences (ACT-4-h-1'), refer to WO 95/12673, and for human OX-40L sequences (ACT-4-h-1-L'), refer to WO 95/21915 and documents referred to therein. Other peptides which may usefully be fused to the OX-40 receptor binding agent include soluble MHC class II molecules, other co-stimulatory molecules such as B7.1 and B7.2, and T-cell enhancing cytokines such as IL-2.

The determination that a particular agent binds substantially only to the OX-40 receptor may readily be made by using or adapting routine procedures. One suitable *in vitro* assay makes use of the Western blotting procedure (described in many standard texts, including "Antibodies, A Laboratory Manual" by Harlow and Lane). To determine that a given OX-40 receptor binding agent, such as a selected fragment of the soluble OX-40L, binds substantially only to the human OX-40 protein, total cellular protein is extracted from human cells that do not express the OX-40 antigen, such as a non-lymphocyte cell (e.g., a COS cell or a CHO cell) transfected with a nucleic acid molecule encoding OX-40. As a negative control, total cellular protein is also extracted from corresponding non-transformed cells. These protein preparations are then electrophoresed on a non-denaturing polyacrylamide gel. Thereafter, the proteins are transferred to a membrane (for example, nitrocellulose) by Western blotting, and the agent to be tested is incubated with the membrane. After washing the membrane to remove non-specifically bound agent, the presence of bound agent is detected by the use of an antibody raised against the test agent conjugated to a detection agent, such as the enzyme alkaline phosphatase; application of the substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium results in the production of a dense blue compound by immuno-localized alkaline phosphatase. Agents which bind substantially only to human OX-40 will, by this technique, be shown to bind to the human OX-40 band (which will be localized at a given position on the gel determined by its molecular weight) in the extract from OX-40 transformed cells, whereas little or no binding will be observed in the extract from non-transformed cells. Non-specific binding of the agent to other proteins may occur and may be detectable as a weak signal on the Western blots. The non-specific nature of this binding will be recognized by one skilled in the art by the weak signal obtained on the Western blot relative to the strong primary signal arising from the

specific agent/human OX-40 protein binding. Ideally, an OX-40 receptor binding agent would not bind to the proteins extracted from the non-transformed cells.

In addition to binding assays using extracted proteins, putative OX-40 receptor binding agents may be tested to confirm their ability to bind substantially only OX-40 receptor *in vivo* by conjugating the agent to a fluorescent tag (such as FITC) and analyzing its binding to antigen activated CD4<sup>+</sup> T-cell and non-activated T-cell populations by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). An agent which binds substantially only the OX-40 receptor will stain only activated CD4<sup>+</sup> T-cells.

Transformed: A transformed cell is a cell into which has been introduced a nucleic acid molecule by molecular biology techniques. As used herein, the term transformation encompasses all techniques by which a nucleic acid molecule might be introduced into such a cell, including transfection with viral vectors, transformation with plasmid vectors, and introduction of naked DNA by electroporation, lipofection, and particle gun acceleration.

Isolated: An "isolated" biological component (such as a nucleic acid or protein) has been substantially separated or purified away from other biological components in the cell of the organism in which the component naturally occurs. I.e., other chromosomal and extrachromosomal DNA and RNA, and proteins. Nucleic acids and proteins which have been "isolated" thus include nucleic acids and proteins purified by standard purification methods. The term also embraces nucleic acids and proteins prepared by recombinant expression in a host cell as well as chemically synthesized nucleic acids.

Purified: The term purified does not require absolute purity; rather, it is intended as a relative term. Thus, for example, a purified OX-40 ligand preparation is one in which the OX-40 ligand is more pure than the ligand in its natural environment within a cell. Preferably, a preparation of an OX-40 ligand is purified such that the OX-40 ligand protein represents at least 50% of the total protein content of the preparation.

Operably linked: A first nucleic acid sequence is operably linked with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Generally, operably linked DNA sequences are contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, in the same reading frame.

Recombinant: A recombinant nucleic acid is one that has a sequence that is not naturally occurring or has a sequence that is made by an artificial combination of two otherwise separated segments of sequence. This artificial combination is often



accomplished by chemical synthesis or, more commonly, by the artificial manipulation of isolated segments of nucleic acids, e.g., by genetic engineering techniques.

**Mammal:** This term includes both human and non-human mammals. Similarly, the term "patient" includes both human and veterinary subjects.

## 2. Compositions and Methods of Enhancing Antigen Specific Immune Response in Animals

The enhancement of an antigen-specific immune response in a mammal by engaging the OX-40 receptor on CD4 T-cells during or after antigen activation can be accomplished using a wide variety of methods. The method of choice will primarily depend upon the type of antigen against which it is desired to enhance the immune response, and various methods available are discussed below. Whatever method is selected, the purified OX-40 receptor binding agent should be administered to the animal such that it is presented to T-cells of the animal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen. Since the activation of T-cells generally takes place within about 3 - 7 days after an antigen is presented to the immune system, it is generally preferable to administer the OX-40 receptor binding agent to the animal by the selected method within about 7 days after the immune system of the animal is exposed to the antigen. Where the OX-40 receptor binding agent is administered simultaneously with the antigen, it may be advantageous to administer a form of the agent which has enhanced stability (i.e., increased half-life) in the body so that the agent will remain in the circulatory system for a sufficient period of time to engage with OX-40 receptor during or after antigen priming. Forms of OX-40 receptor binding agent having such enhanced stability include fusion proteins comprising the soluble OX-40 ligand fused to, for example, the constant region of human IgG. To determine the half-life of any selected OX-40 receptor binding agent, standard methods may be used. For example, after administration of the agent by intravenous injection, a small blood sample is removed from the animal, with subsequent samples being taken every 6-24 hours over the period of about 10 days. Thereafter, the concentration of the agent present in each sample is determined (e.g., using standard immunological quantification methods, such as those discussed in Harlow & Lane, 1988, e.g., ELISA). The half-life of the agent is defined as that time point at which the concentration of the agent falls to 50% of that in the first sample measurement.

In some situations, for example where the antigen is presented to the immune system over an extended duration (for example, in cancer patients), the OX-40 receptor binding agent may be administered more than 7 days after the immune system is exposed to the antigen. For example, following surgical removal of a primary tumor from a patient, an OX-40 receptor binding agent may be administered to enhance the immune

response to tumor antigens present on metastases, thereby promoting the clearance of such metastases from the body. In such a situation, administration of the OX-40 receptor binding agent will usually occur more than 7 days after the immune system of the patient was first exposed to the tumor antigens, but will nevertheless be present when the antigens are being presented to T-cells.

While the molecule which engages the OX-40 receptor will typically be a protein, such as an anti-OX-40 antibody or an OX-40 ligand, the preparation administered to the mammal may take a number of forms, including a preparation of a purified OX-40 receptor binding agent, a nucleic acid molecule which encodes the OX-40 receptor binding agent, a cell or a virus which expresses the OX-40 receptor binding agent, or a preparation derived from such a cell or virus.

In its simplest form, the preparation administered to the mammal is an OX-40 receptor binding agent, administered in conventional dosage form, and preferably combined with a pharmaceutical excipient, carrier or diluent. Suitable pharmaceutical carriers may be solids or liquids, and may include buffers, anti-oxidants such as ascorbic acid, other polypeptides or proteins such as serum albumin, carbohydrates, chelating agents and other stabilizers and excipients. Suitable solid carriers include lactose,

magnesium stearate, terra alba, sucrose, talc, stearic acid, gelatin, agar, pectin, anacard and cocoa butter. The amount of a solid carrier will vary widely depending on which carrier is selected, but preferably will be from about 25mg to about 1g per dose of active agent. Suitable liquid carriers include neutral buffered saline, optionally with suitable preservatives, stabilizers and excipients. The carrier or diluent may also include time delay material well known to the art such as, for example, glycerol distearate, either alone or with a wax. The foregoing examples of suitable pharmaceutical carriers are only

exemplary and one of skill in the art will recognize that a very wide range of such carriers may be employed. Liposome-based delivery systems may also be employed to deliver OX-40 receptor binding agents. Liposome-based systems, which may be employed to provide a measured release of the agent over time into the bloodstream, are well known in the art and are exemplified by the systems described in U.S. Patent Nos. 4,386,187 (Sandoz; LA Kelly; "Liposome drug delivery systems"), 5,680,576 (Imark; EC Unger et al.; "Therapeutic drug delivery systems"), 5,695,766 (Inex Pharm and Univ of BC; MB Bally et al.; "Liposomal compositions for enhanced retention of bioactive agents") and 5,185,837 (Nova Pharm; AJ Dornis; "Liposomes for controlled delivery of substances"), and documents cited therein.

The formulation of the OX-40 receptor binding agent with a pharmaceutical carrier can take many physical forms, but is preferably a sterile liquid suspension or solution, suitable for direct injection. Preferably, the patient will be administered the OX-

40 receptor binding agent in a formulation as described above (i.e. in combination with a pharmaceutical carrier), wherein the formulation includes a clinically effective amount of the agent.

As used herein, "a clinically effective amount" is an amount that results in a clinically significant effect. This nature of this effect will vary with the clinical context in which the OX-40 receptor binding agent is being used, for example, whether the agent is being administered as a therapeutic (e.g., to treat an infectious disease, or cancer) or as a prophylactic (e.g., as a vaccine). In the therapeutic context, if the OX-40 receptor binding agent is being administered to a cancer patient, it will be appreciated that any improvement in the patient's condition is clinically significant. Hence, in such a situation, "a clinically effective amount" encompasses amounts of the OX-40 receptor binding agent that result in at least partial remission of the cancer as well as amounts which slow or limit the further progression of the cancer. Similarly, in the therapeutic context where the agent is being used to enhance the immune response of a patient to an infectious agent, such as a virus or a bacterium, where the patient is already infected with the agent, a clinically effective amount is an amount that results in a clinically significant effect, meaning an effect which results in some degree of remission of the infection or the clinical symptoms.

In the prophylactic context, such as vaccination, a clinically effective amount of an OX-40 receptor binding agent is an amount sufficient to provide an enhancement of the immune response to the target antigen, i.e., to produce an immune response greater than would be presented absent administration of the OX-40 receptor binding agent. Quantification of the immune response arising from a vaccination may be achieved in any standard way, e.g., measurement of serum antibody titer for level and/or duration against any convenient test antigen, and/or lymphoproliferation in response to test antigen *in vitro*.

It will be appreciated that a clinically effective dose of an OX-40 receptor binding agent will vary depending upon the actual OX-40 receptor binding agent being used (e.g., whether it is a soluble OX-40 ligand or an anti-OX-40 antibody fragment), the clinical context (e.g., whether the agent is being used therapeutically or prophylactically), the characteristics of the patient (age, weight, other medications being taken, etc.) and, in the therapeutic context, the severity of the condition. Thus, the assessment of a clinically effective dosage will ultimately be decided by a physician, veterinarian, or other health care worker familiar with the patient. Typically, administering OX-40 receptor binding agent to a mammal according to the methods of the present invention will involve administration of from about 10 ng to 1 g of OX-40 receptor binding agent per

dose, with single dose units of from about 10 µg to 100 mg being commonly used, and specific dosages of up to 1 mg or 10 mg also being within the commonly used range.

For therapeutic applications, the OX-40 receptor binding agent may be administered to a patient through a number of routes, including intravenously or, where the patient has a tumor, directly into the tumor site. The agent may be the sole active ingredient in the composition, or it may be combined with other agents having a beneficial effect, such as an interferon or other immune-stimulatory molecules.

In the prophylactic (vaccine) context, the OX-40 receptor binding agent may be administered to an animal in combination with a conventional vaccine preparation, such as a vaccine preparation comprising bacterial or viral antigens. The OX-40 receptor binding agent may be combined with the conventional vaccine, or may be administered as a separate preparation along with the conventional vaccine. As noted above, the selection of an appropriate OX-40 receptor binding agent will be made to ensure that the agent remains in the circulatory system long enough to engage OX-40 receptors on T-cells during antigen priming (i.e., about 3-7 days after administration of the antigen). Preferably, where the OX-40 receptor binding agent is administered separately, it is administered within about a week of the vaccine being administered. Conventional vaccine preparations suitable for use in the present invention include those prepared with purified bacterial antigens, heat killed bacteria, subunit vaccines and viral vaccines based on live or attenuated virus.

Where the OX-40 receptor binding agent is administered to the mammal in a single preparation with the vaccine antigens, the preparation may be formulated simply by mixing a clinically effective amount of an OX-40 receptor binding agent to the antigen preparation. Alternatively, the OX-40 receptor binding agent may be produced along with the antigen. For example, where the antigen to be administered as a vaccine is a bacterial antigen or a mixture of bacterial antigens, the bacterium from which the antigen preparation is prepared may be a transgenic bacterium which expresses the OX-40 receptor binding agent. In such a situation, the OX-40 receptor binding agent is directly obtained in combination with the bacterial antigens. Similarly, vaccines comprising tumor antigens and OX-40 receptor binding agent may be prepared from tumor cells which express the OX-40 receptor binding agent. Methods of expressing proteins such as OX-40 ligand in transgenic prokaryotic and eukaryotic cells are well known and are described in standard laboratory texts such as Sambrook et al. (1989).

In other embodiments, the present invention contemplates that the immune response of a mammal to a particular antigen may be enhanced by administering to the mammal a nucleic acid molecule which encodes an OX-40 receptor binding agent. Such a nucleic acid molecule is preferably administered either within a cell, or as part of a viral

genome, but may also be administered directly as a "naked" nucleic acid molecule. For example, a nucleic acid molecule encoding an OX-40 receptor binding agent may be introduced into an attenuated bacterium (i.e., a form of the organism which does not cause significant disease when administered to a mammal) in a plasmid vector such that the OX-40 receptor binding agent is expressed on the surface of the bacterium. The bacterium may be administered to the mammal in the same manner as a conventional attenuated bacterium vaccine. Alternatively, the nucleic acid molecule encoding the OX-40 receptor binding agent may be introduced into the genome of a virus that is used as a live attenuated vaccine. Attenuated viruses include those in which an essential gene has been deleted, as described in U.S. Patents Nos. 5,665,382 and 5,837,261 (Cantab Pharmaceuticals; Inglis et al.). Viruses suitable for this purpose include DNA viruses, such as adenovirus, herpes, papovae, papilloma and parvo viruses, as well as RNA viruses such as poliovirus and influenza virus. Methods of preparing viruses carrying heterologous nucleic acid sequences that may be used as viral vaccines are described in U.S. Patents Nos. 5,665,382 and 5,837,261 (supra), 5,338,883 (Health Research; E Paolletti) and 5,494,807 (E Paolletti).

In another embodiment, a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent may be introduced into a tumor cell. In many cancer patients, the tumor cells escape detection by the immune system by mechanisms such as down-regulating MHC and/or co-stimulatory molecule expression. Accordingly, one method of treatment previously proposed has been to remove tumor cells from the patient and introduce into them nucleic acids encoding, for example, MHC class II, the co-stimulatory molecule B7 and the stimulatory/adhesion molecule CD2 (see, for example, European Patent Application publication number EP 0 733 373 and references cited therein). Applying the discovery disclosed herein to those methods, introducing a nucleic acid molecule encoding an OX-40 receptor binding agent into tumor cells is expected to provide considerable benefit.

All types of tumor are potentially amenable to treatment by this approach including, for example, carcinomas of the breast, lung, pancreas, ovary, kidney, colon and bladder, as well as melanomas and sarcomas. Nucleic acid molecules encoding a OX-40 receptor binding agent are incorporated into a vector suitable for expression of the OX-40 receptor binding agent in tumor cells. Suitable vectors include plasmid, cosmid and viral vectors, such as retroviruses, adenoviruses and herpesviruses. Disabled viruses, such as those described in U.S. Patents Nos. 5,665,382 and 5,837,261 may be employed for this purpose. Because of the high efficiency with which viral vectors infect mammalian cells, viral vectors are expected to offer advantages over other vector types. In addition to a nucleic acid molecule encoding an OX-40 receptor binding agent, other nucleic acid molecules may also be introduced into the vector to further enhance the immunogenic

effect. By way of example, such other nucleic acid molecules include nucleic acids encoding MHC class II proteins (including  $\alpha$  and  $\beta$  subunits), and other co-stimulatory molecules, such as B7.1 and B7.2. If desired, a nucleic acid molecule encoding a selectable marker may also be introduced into the vector, such that those tumor cells successfully transformed with the vector can be readily selected.

The vector is then introduced into the tumor cell by one of a range of techniques, such as electroporation, lipofection, co-cultivation with virus-producing cells, or other standard means. In a preferred embodiment, the tumor cells are cells removed from the patient to be treated, but the tumor cells may alternatively be cells from a tumor cell line, such as the human tumor cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC).

If it is desired to screen the cells to select those into which the vector was introduced, this may be achieved by a number of means, including selecting for expression of the selectable marker if one is used, or screening for expression of the OX-40 receptor binding agent on the surface of the cells. This latter procedure may be conveniently performed using a fluorescence activated cell sorter (FACS).

The tumor cells are subsequently administered to the patient in combination with a suitable carrier such as buffered water, saline, or glycine. In a preferred embodiment, where the tumor cells are cells originally removed from the patient, they are attenuated before being administered to the patient. An attenuated cell is one which is metabolically active but which is no longer able to proliferate. Methods for attenuating tumor cells are well known and include those described in EP 0 733 373.

In an alternative embodiment, cell membranes from the tumor cells, which include the OX-40 receptor binding agent may be administered to the patient instead of intact tumor cells. A cell membrane preparation can readily be prepared by disrupting or lysing the cells using standard techniques, such as a French Press, freeze-thawing, or sonication. Following disruption of the cells, a membrane enriched fraction may be obtained by centrifugation.

Nucleic acid molecules encoding an OX-40 receptor binding agent may alternatively be administered directly to the patient in the form of "naked" DNA, such that expression of the OX-40 receptor binding agent occurs in the patient's body. Methods of administering naked DNA to animals in a manner to cause expression of that DNA in the body of the animal are well known and are described, for example, in U.S. Patents Nos. 5,620,866 (Univ Massachusetts Med Ctr; JE Hermann et al.; "DNA vaccines against rotavirus infections"), 5,643,578 (Univ Massachusetts Med Ctr & St. Jude Children's Res Hosp; HL Robinson et al.; "immunization by inoculation of DNA transcription unit") and

5,593,972 (Wistar Inst. & Univ. of PA; DB Weiner et al.; "Genetic Immunization"), and references cited therein.

The present invention also encompasses other immunotherapy methods for treating conditions such as cancer, including adoptive immunotherapy. As is known in the art, adoptive immunotherapy involves obtaining lymphoid cells exposed to a particular antigen, culturing those cells *ex vivo* under conditions whereby the activity of the cells is enhanced, and then administering the cells to an individual. The lymphoid cells are preferably T-cells removed from a cancer patient, for example T-cells from a draining lymph node. The present invention teaches that engaging the OX-40 receptor on these cells with an OX-40 receptor binding agent will stimulate these cells and enhance the number of memory cells produced from these cells. Accordingly, one aspect of the present invention is a form of adoptive immunotherapy in which the incubation of lymphoid cells *ex vivo* is performed in a medium containing an OX-40 receptor binding agent prior to administration of the cells to a patient. The technical details of methods for obtaining lymphoid cells, *ex vivo* cultivation of such cells with immune stimulants, and administration to patients are known in the field and are described, for example in U.S. Patent Nos. 4,890,816 (US DHHS; SA Rosenburg; "Adoptive immunotherapy as a treatment modality in humans"; 5,229,116 (Immunex; DA Lynch; "Adoptive immunotherapy with interleukin-7"); 5,831,006 (Endotronics; GB Maftak et al.; "Immunotherapy protocol of culturing leukocytes in the presence of Interleukin-2 in a hollow fiber cartridge"; and 4,902,288 (M Ingram; "Implantable immunotherapy system using stimulated cells"), and references cited therein.

### 3. Examples

The following examples illustrate methods and materials of use in connection with the present invention, and also indicate efficacy of the present invention.

#### Example 1: Stimulation of Antigen-Specific T-cell with OX-40 Receptor Binding Agent

To demonstrate that OX-40 receptor binding agents can stimulate antigen-specific T-cells, *in vitro* T-cell proliferation assays were conducted using myelin basic protein (MBP) specific T-cells and anti-OX-40 mAb as the OX-40 receptor binding agent. After expansion in RPMI and 10% FCS, MBP-specific T cells were harvested, washed, counted and resuspended in media for use in the T-cell proliferation assay described by Vandenbark et al. (1985).  $2 \times 10^5$  T cells were stimulated in 96-well flat bottom plates for 48 hours in stimulation medium, and pulsed for 18 hr with  $1 \mu\text{Ci} [^3\text{H}]$ -TdR. The cells were harvested and mean thymidine incorporation (cpm) was calculated

from triplicate wells. Monoclonal antibodies to rat CD3, OX-40, and CD28 were commercially obtained from Pharmingen (La Jolla, CA).

To examine the effect of OX-40L on T-cell proliferation *in vitro*, T-cells were seeded in a 96-flatwell plate at  $2 \times 10^5$ /well and stimulated with 10  $\mu\text{g/ml}$  of either soluble or plate-bound anti-CD3 plus increasing concentrations of anti-OX-40 antibody. The cells were cultured for 48 hr, labeled with  $^3\text{H}$ -thymidine for 18 hr, and were then harvested and counted. The results, shown in Fig. 2, are presented as mean CPM with standard deviation calculated from triplicate wells. The results indicate that the OX-40 receptor binding agent (i.e., the anti-OX-40 mAb) produced a dose-dependent costimulation/mitogenesis of the MBP specific CD4<sup>+</sup> T-cells.

#### Example 2: OX-40 Receptor Engagement is an Effector Stage

To determine the stage of T-cell development (i.e., naive or effector cell) at which OX-40 receptor engagement is effective, a fibroblast cell line expressing the murine IE<sup>b</sup> MHC class II molecule was utilized (Dubey et al., 1995). This cell line can present antigen (pigeon cytochrome c, (PCC)) to T-cells from the T-cell receptor transgenic mice described by Kaye and Hedrick (1989). Using this cell line, a transgenic fibroblast cell line was produced which expresses OX-40 ligand and can stimulate splenic CD4<sup>+</sup> T-cells from the T-cell receptor transgenic mice.

Experiments comparing the effect of stimulating naive T-cells taken directly from the mice with PCC antigen in combination with fibroblasts expressing (1) MHC class II alone, (2) MHC class II and B7.1, (3) MHC class II and OX-40 ligand, or (4) MHC class II, OX-40 ligand and B7.1 showed that the MHC class II/OX-40 ligand/B7.1 combination was the best stimulator of naive T-cells (data not shown).

Thereafter, naive T-cells taken directly from the animals were stimulated with PCC antigen and fibroblasts expressing MHC class II and B7.1, to produce effector cells. These effector cells were then expanded in IL-2 for 5 days, washed and restimulated with PCC antigen and in combination with fibroblasts expressing (1) MHC class II alone, (2) MHC class II and B7.1 or (3) MHC class II and OX-40 ligand. The experiment was performed using three different ratios of APC:T-cells, and the effect of this second stimulatory event was measured by quantifying IL-2 production. The results, depicted in Fig. 3, showed that presentation of the antigen by APCs expressing MHC class II and the OX-40 ligand was the most potent stimulator of the effector stage T-cells. Accordingly, it appears that OX-40 receptor engagement is more important at the effector T-cell stage, suggesting that engagement of the OX-40 receptor plays a role in the development of CD4<sup>+</sup> T-cells at the effector stage and may enhance memory cell development. This clearly differentiates the effect of costimulation by OX-40L from co-

stimulation by previously described co-stimulatory molecules, which act at the naive cell to effector cell transition.

**Example 3: OX-40 Receptor Binding Agent Induces Tumor Resistance**

To demonstrate the effect of providing OX-40 receptor binding agent to T-cells during tumor priming in vivo, experiments were performed using soluble OX-40L fused to the Fc portion of human IgG ("OX-40L:HuFcIgG") as the OX-40 receptor binding agent.

The inoculation protocol for this series of experiments was performed by subcutaneously inoculating mice on day 0 with between  $1-3 \times 10^5$  MCA 303 sarcoma tumor cells (Huntzicker & Fox, 1995). Three days later the animals were given intraperitoneal injections with OX-40L:HuFcIgG, and were given a second dose on day 7 after tumor inoculation (the dose varied depending upon the experiment, see details below). The animals were then monitored for tumor growth for 50 days or greater. Animals were sacrificed when the tumors became  $0.3 \text{ in}^2$  in size.

Figure 4 shows the remarkable effect of soluble OX-40 ligand injected i.p. on 3 day established tumor. Six animals were injected with  $3 \times 10^6$  MCA 303 tumor cells that were in vivo passaged. Three animals received  $100 \mu\text{g}$  in  $500 \mu\text{l}$  of RPMI of soluble murine OX-40 ligand i.p. and three animals received  $500 \mu\text{l}$  of RPMI alone, three and seven days after tumor inoculation. The animals were monitored for signs of tumor for 50 days post-inoculation. As shown in Fig. 4, while all of the animals that received tumor cells with no OX-40L died within 38 days, the animals that did receive OX-40L remained tumor-free.

Thereafter, animals that had been treated with soluble OX-40 ligand during tumor priming and had become resistant to tumor challenge were depleted of CD8<sup>+</sup> T cells by administration of anti-CD8 i.p. These animals were sacrificed and their splenocytes were isolated and phenotyped to show that the CD8<sup>+</sup> T cells were depleted. The spleen cells were adoptively transferred into naive mice (1 spleen equivalent/mouse), and the recipient mice were challenged with MCA 303 tumor 9 days post-transfer. An equivalent cell number of MCA 303 tumor was inoculated into control naive mice and all animals were monitored for signs of tumor for 80 days post-inoculation. As shown in Fig. 5, while all animals receiving only the tumor cells died within 31 days of administration of the tumor cells, all of the animals receiving the transferred splenocytes from tumor-immune animals remained healthy. This experiment indicates that the effect of administering the OX-40 receptor binding agent to the mice along with the tumor cells produces a sufficient population of tumor antigen specific memory T-cells to confer immunity after adoptive transfer. It is therefore evidence that

co-stimulating effector T-cells by engaging the OX-40 receptor is important in the effector/memory cell transition.

**Example 4: OX-40 Receptor Binding Agent Confers Resistance to In Vivo Passaged Tumor Cells**

The protection conferred by administration of OX-40L described in Example 3 was against in vitro passaged tumor cells. Since in vivo passaged tumor cells are significantly more tumorigenic, the ability of OX-40L to confer protection against in vivo passaged cells was examined. Ten animals were injected subcutaneously with  $1 \times 10^5$  MCA 303 cells that were passaged in vivo. Five animals were injected i.p. with  $100 \mu\text{g}$  of soluble OX-40 ligand and five animals were injected with the same volume of RPMI, three and seven days after tumor inoculation. The animals were followed for signs of tumor 80 days post tumor inoculation. The results, shown in Fig. 6 indicate that administration of OX-40L confers enhanced protection even against the highly tumorigenic in vivo passaged tumor cells.

The ability of OX-40L to confer protection against in vivo passaged tumor cells was also examined using differing doses of OX-40L. Twenty animals were injected subcutaneously with  $1 \times 10^5$  in vivo passaged MCA 303 tumor cells. The animals were separated into 5 groups and were injected with increasing amounts of the soluble OX-40 ligand i.p. on days 3 and 7 after tumor inoculation. The control group received RPMI, while the dose titration was performed with 25, 50, 100, and  $250 \mu\text{g}$  OX-40L per injection. The animals were followed for signs of tumor for 86 days post tumor inoculation. The results, shown in Fig. 7, indicate that the enhanced tumor resistance exhibited by animals receiving OX-40L is dependent on the dose of OX-40L received, and that, even against the virulent in vitro passaged tumor cells, 50% survival is achievable with higher doses of OX-40 receptor binding agent.

**Example 5: OX-40 Receptor Binding Agents as Component of Tumor Vaccine**

This Example demonstrates the efficacy of OX-40 receptor binding agents in tumor vaccines. A B16-melanoma mouse cell line, F10, which does not express MHC class II or the OX-40 ligand was transfected (with Lipofectin) with the cDNAs for the OX-40 ligand and CIITA. The CIITA cDNA codes for a protein that binds to the MHC class II promoter and potentiates the synthesis and cell surface expression of the endogenous MHC class II genes. These two genes were co-transfected into the parental F10 line and three variants were isolated: 1) MHC class II<sup>+</sup>, 2) OX-40 ligand<sup>+</sup> and 3) MHC class II<sup>+</sup> and OX-40 ligand<sup>+</sup>. These transfection variants and the parental line were irradiated with 500 rads and injected subcutaneously into naive animals (2 x

10<sup>6</sup> cells/injection) and the vaccination procedure was repeated 14 days later. The immunized animals were challenged with the F10 parental cell line (5 x 10<sup>6</sup>/animal) injected subcutaneously.

Figure 8 shows the result of an experiment in which naive animals were injected with irradiated parental F10 tumor. F10 tumor that is hygromycin resistant, F10 expressing MHC class II alone, or F10 expressing MHC class II and OX-40 ligand. Two weeks later these animals were challenged with live parental F10 tumor and the animals were followed for signs of tumor for 84 days. As shown in Fig. 8, animals that received no initial immunization succumbed quickly to the F10 tumor cells, whereas initial immunization with the irradiated F10 tumor conferred some degree of protection. Greater protection was seen with animals that were immunized with the irradiated F10 cells expressing MHC class II, and maximal protection was observed when immunization was performed using F10 cells expressing both MHC class II and OX-40L. This result is expected since F10 cells which do not express MHC class II would be greatly impaired in their ability to interact with the T-cell receptor. Many tumor cells down-regulate or completely abolish MHC class II expression. Therefore, in clinical application, it may be advantageous to transfect tumor cells removed from a patient with nucleic acid molecules encoding MHC class II and an OX-40 receptor binding agent, before the cells are returned to the patient.

#### Examples 6-9

In the following further examples, the OX-40 receptor (OX-40R) was engaged with either OX-40 ligand (OX-40L) or an antibody agonist to deliver a costimulatory signal to effector T cells, and this was observed to enhance a tumor-specific T cell response. Injection of OX-40L or anti-OX-40R in vivo during tumor priming led to a percentage of tumor-free survivors (20-55%) from 4 different tumors derived from 4 separate tissues. The anti-OX40R effect was dose-dependent and accentuated tumor-specific T cell memory. The data of these examples is believed to indicate that engagement of the OX-40R in vivo augments tumor-specific priming by stimulating/expanding the natural repertoire of the host's tumor-specific T cells. The appearance of OX-40<sup>+</sup> T cells clustered around human tumor cells in vivo also is believed to indicate that this is a practical approach to expand tumor reactive T cells and thereby enhance tumor immunotherapy in patients with cancer.

#### Example 6: OX-40R Expression in Human Breast Cancer

In order to determine the spatial relationship between OX-40R<sup>+</sup> T cells and tumor cells, several human breast cancer biopsies were examined by

Immunohistochemistry. Both primary tumors and tumor invaded lymph nodes were analyzed for CD4<sup>+</sup> and OX-40R<sup>+</sup> cells. Fig. 9 is a representative sample from two separate patients both with infiltrating ductal breast carcinoma. Panel A depicts tumor infiltrating lymphocytes within a 1<sup>st</sup> tumor, while panel B depicts a tumor infiltrated lymph node. Panel A shows that CD4<sup>+</sup> cells are infiltrating the tumor around the outer edge of the surgical specimen. The OX-40R<sup>+</sup> cells were visualized (at higher magnification) and were a subset of the invading lymphocytes which were in close proximity to the tumor cells. A number of the OX-40R<sup>+</sup> cells appear to be larger (blebs) with some exhibiting the appearance of lymphocytes undergoing mitosis. Panel B depicts a lymph node where more than half of the architecture has been invaded by the tumor. There is an abundance of CD4<sup>+</sup> cells that surround the invading tumor. The OX-40R<sup>+</sup> cells were found concentrated in areas directly adjacent to the invading tumor cells. There were OX-40R<sup>+</sup> cells also found in areas that were not invaded by tumor, but the highest percentage were found closest to the site of tumor infiltration. It is believed that OX-40R<sup>+</sup> cells within these tissue sections most likely represent tumor-specific T cells.

#### Example 7: Engaging The OX-40R In Vivo During Tumor Priming (Sarcoma)

Without wishing to be bound by theory, it is believed that OX-40R<sup>+</sup> cells at the tumor site or draining lymph nodes are most likely tumor-specific T cells in vivo.

Engaging the OX-40R is believed to cause a potent costimulatory response leading to T cell proliferation, increased cytokine production, and enhanced survival of effector T cells. Figure 10 shows results of tests designed to investigate whether engaging the OX-40R in vivo during tumor priming would lead to an enhanced anti-tumor specific response. Figure 10 depicts mice that were injected with a lethal inoculum of MCA 303 (methyl-cholanthrene induced sarcoma) subcutaneously (s.c.) and were treated 3 and 7 days later with either mOX-40L:lg, DR3:lg, or saline. Mice treated with DR3:lg had to be sacrificed due to tumor growth with similar kinetics as the mice receiving saline. In contrast, mice that received mOX-40L:lg were all delayed in tumor growth and 60% remained tumor-free for greater than 70 days. The mOX-40L:lg protected mice were rechallenged with MCA 303 tumor s.c. and the mice remained tumor-free, believed to indicate that they had developed a tumor-specific memory T cell response.

Mice injected with MCA 303 were then subjected to a dose-titration of mOX-40L:lg on days 3 and 7 post-tumor inoculation. Mice that received 25 or 50 micro-g of mOX-40L:lg had to be sacrificed due to tumor growth in a similar time frame as the control saline-treated mice. Fifty percent of the mice receiving 100 micro-g of mOX-

40L:lg experienced a delay in tumor growth, while 100% of the mice receiving 250 micro-g were delayed in tumor growth. Ultimately, 25% of the 100 micro-g group and 50% of the 250 micro-g group were tumor-free for more than 70 days post-tumor challenge. It should be noted that the MCA 303 tumor line gets more tumorigenic and less immunogenic the more times that it is passaged *in vivo*. The MCA 303 tumor line in Fig. 11 had been passaged more times *in vivo* than Fig. 10, therefore the OX40L:lg treatment is believed to have given a slightly lesser amount of effect at the 100 micro-g dose.

Fig. 12 shows the fate of mice inoculated with *in vitro* passaged MCA 303 and then treated with mOX-40L:lg (in *vitro* passaged MCA 303 was easier to treat). Mice were inoculated with tumor s.c. and injected with mOX-40L:lg on days 3 and 6 post-tumor inoculation. Panel 4A shows that all the mOX-40L:lg treated mice survived the initial tumor challenge while all the mice injected with saline had to be sacrificed due to excessive tumor burden. The mOX-40L:lg treated mice that survived the initial tumor challenge (Fig. 12A) were then rechallenged with MCA 303 and all the mice were immune to the second challenge for 83 days (data not shown). These same animals were then inoculated with MCA 303 s.c. and 10 days later were depleted of CD8 cells by injecting an anti-Lyt 2 intraperitoneally (i.p.). Three days later these mice were sacrificed and shown to be devoid of CD8 cells (<2%) in the spleen and  $1.45 \times 10^7$  of these spleen cells were transferred into naïve mice. Fifteen days later the mice were challenged with MCA 303 s.c. and Fig. 12B shows that the mice receiving the CD8 depleted immune cells were resistant to tumor challenge while the control mice had to be sacrificed due to tumor burden.

#### Example 8: OX-40R Specific Treatment in a Weakly Immunogenic Tumor Model (B16/F10)

The F10 variant of the B16/B16 melanoma line does not elicit a protective immune response when injected as an irradiated vaccine s.c. (data not shown), and has therefore been characterized as a weakly immunogenic tumor. Figure 13 shows results of tests designed to determine if engaging the OX-40R during tumor priming would enhance immunity to this aggressive tumor. Fig. 13A shows that treating mice with mOX-40L:lg on days 3 and 7 post-inoculation with F10 was effective compared to the control mice (approximately 25% survived tumor challenge long-term). Fig. 13B shows that a separate reagent that binds to the OX-40R (monoclonal Ab OX-88) delivered at the same dose enhanced tumor-free survival to a similar level as mOX-40L:lg. The percentage of tumor-free mice for the Ab treatment was very similar to OX-40L:lg and

both reagents were shown to provide statistically relevant tumor protection by log rank analysis ( $p < .007$  (Ab) and .05 (mOX40L:lg)).

#### Example 9: Enhancement of Anti-Tumor Immunity in Colorectal Cancer Model (CT26)

A similar protocol was designed to treat mice with CT26 tumor cells injected s.c. as described above (mOX-40L:lg - two dose regimen). mOX-40L:lg was used as a negative control because it does not bind to the murine OX-40R. In an initial experiment the two dose regimen was able to enhance tumor-free survival significantly ( $p = .04$  (data not shown). The identical experiment was then performed as above except with multiple injections after tumor inoculation (injections given on days 2, 7, 14, 21, 27, and 40). Fig. 14A shows that multiple injection was beneficial to tumor-free survival with a p-value of higher confidence ( $p = .01$ ) than the two injection dose scheme. Seven of the surviving mice from the mOX-40L:lg treated group were then rechallenged with CT26. Fig. 14B shows that all of the mOX40L:lg mice resisted the challenge and remained tumor-free, while all the naïve control mice succumbed to the tumor challenge. The 7 tumor-free mice were then rechallenged with a syngeneic tumor from a different tissue origin (flanka - renal origin) to test for a tumor-specific response. Six of 7 of the CT26 resistant mice had to be sacrificed due to tumor burden associated with the Renca tumor, which is believed to indicate that the CT26-resistant mice had specificity for tumor antigens associated with colon cancer.

#### Summary of Examples 8-9: OX-40R Engagement During Tumor Priming

Table 1 summarizes the data in four tumor models, examples 8-9, in which immunogenic tumors respond to a greater degree to the therapy, but still a degree of therapeutic results was also seen in the poorly immunogenic melanoma model (F 10). Data for all the tumor lines have been shown in the previous figures except for the SM1 breast cancer line. The SM1 tumor cell line is weakly immunogenic (data not shown). Mice that have been injected with the SM1 tumor and subsequently OX40L:lg on days 3 and 7 post-tumor inoculation had enhanced anti-tumor activity as shown by the increase of tumor-free survival. The SM1 data was subjected to log-rank statistical analysis and shown to be significant with a p value = .01.

Table I:

Examples 6-9: Summary of OX-40R Engagement During Tumor Priming

5	Tumor Origin	Immunogenicity	Treatment	Tumor Free/ Injected Mice
6	MCA 303 (Sarcoma)	Moderate	mOX-40L:lg saline or DR3:lg	9/16 0/16
10	CT26 (Colon Carcinoma)	Moderate	mOX-40L:lg hOX-40L:lg	8/24 2/24
15	SM1 (Breast Cancer)	Weakly	mOX-40L:lg saline	7/28 1/28
20	B 16/F10 (Melanoma)	Poorly	mOX-40L:lg saline antiOX-40R rat lg	5/20 0/20 6/25 0/25

It is believed that engaging the OX-40R in vivo during tumor priming showed a significant therapeutic benefit in several tumor models. The effect was dose dependent and created long-lasting tumor-specific immunity in the mice that were cured from the initial tumor challenge. Other data showing that the OX-40R<sup>+</sup> cells within the inflammatory lesions in EAE were the T cells that responded to autoantigen suggest that the experiments described here were targeting the tumor-Ag specific cells with the OX-40R-specific therapy. It has been shown that engaging OX-40R in vitro causes a potent costimulatory event that enhances T cell cytokine production, proliferation, and survival. Therefore engaging the OX-40R during tumor priming is believed to be enhancing tumor-Ag specific CD4<sup>+</sup> T cell expansion and function leading to tumor-free survival. The appearance of OX-40R<sup>+</sup> T cells adjacent to tumor cells in breast cancer biopsies suggests that these findings can be applied in human clinical trials with similar therapeutic effects.

Engaging OX-40R in vivo during tumor priming led to a percentage of tumor-free mice in 4 different solid tumors emanating from 4 separate tissue types. The data suggest that OX-40R based therapy can generally enhance the immune system, not only for tumor immunity, but also as an immunologic adjuvant for all vaccine types (viral, bacterial, etc.). OX-40R specific immune enhancement has been described with a showing that an antibody to the OX-40R, delivered in vivo, could exacerbate autoimmune disease and convert a chronic form of GVHD to acute GVHD.

It is believed that huOX-40L:lg fusion protein is an example of a protein applicable to the present invention that can be used in human clinical trials and can stimulate human T cells in vitro. Both the antibody and the soluble OX-40L fusion

protein can work with similar potency in the tumor models mentioned here (Fig. 13 and other data not shown), but it is possible that the antibody may have some advantage in the future if it turns out to be less immunogenic and to have a longer-half life in vivo.

Enhancement of tumor immunity with antibodies such as anti-4-1BB or anti-CTLA4 are other examples of T cell activation antigens which when triggered or blocked enhance tumor-specific immunity. Like the OX-40R, the 4-1BB receptor was originally described as a T cell activation antigen that is a member of the TNF-receptor family and has potent costimulatory properties. The 4-1BB receptor is expressed on CD8 and CD4 T cells as well as NK cells. The 4-1BB receptor costimulatory function appears to be primarily effective on CD8<sup>+</sup> T cells, and engagement of this receptor during tumor priming led to a 50-fold increase in tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cell cytolytic function and enhanced tumor-free survival. The CTLA-4 protein is expressed on both CD8 and CD4 T cells and when engaged by its ligand(s) (B7.1 or B7.2) induces a down-regulatory signal to the T cell. Antibodies that block CTLA-4/B7 interaction enhance Ag-specific T cell function and can ultimately enhance tumor specific immunity. The OX-40R specific therapy was potent on its own but has not yet led to 100% tumor-free mice, therefore therapy combining anti-CTLA4 or anti-4-1BB with anti-OX-40R engagement according to the present invention may provide advantageous embodiments of the present invention, to accentuate Ag-specific T cell therapy. Alternative tumor-specific T cell therapies can combine two or more of these antibodies during tumor priming with the aim of enhancing both CD4 and CD8 Ag specific effector/memory T cell responses.

In vivo engagement of the OX-40R during Ag specific priming is believed to increase the number and life-span of Ag-specific CD4<sup>+</sup> T cells (data not shown). Most T cells become susceptible to activated induced cell death (AICD) after encountering Ag at the effector T cell stage and only a few go on to become memory T cells. It is believed that engaging the OX-40R during tumor priming targets the tumor-reactive CD4<sup>+</sup> T cells and spares them from AICD. Increasing numbers of Ag-specific cells allows the mice to stay tumor-free and fight a secondary tumor challenge. Fig. 11B shows that OX-40R treated tumor-immune mice can confer anti-tumor immunity through the adoptive transfer of CD8-depleted spleen cells. This data suggest that there is an increase and/or enhancement of tumor-Ag specific memory CD4<sup>+</sup> T cells and they are able to transfer adoptive protection. CD4<sup>+</sup> T cells may not be the ultimate effector cells that interact with the tumor because in all four models the tumor cells do not express MHC class II. Nevertheless enhanced cytokine production by tumor Ag specific CD4<sup>+</sup> T cells may be effective by helping to activate CD8<sup>+</sup> T cells, NK cells, and macrophages which in turn can directly interact with and destroy tumors.



OX-40R is believed only to be expressed on CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the inflammatory site in cancer and autoimmune disease and is turned over quite rapidly within 24-48 hr. However, it has been shown that both CD4 and CD8 T cells can express OX-40R if stimulated *in vitro* with Con A or PHA. It appears that the only way to upregulate OX-40R expression on T cells is through TCR engagement. Even in highly inflammatory situations, such as superAg stimulation, there appears to be no bystander upregulation of the OX-40R on Ag non-specific cells. In mice injected with the superantigen SEA, the OX-40R is only expressed on Vbeta3/CD4<sup>+</sup> T cells which is the target TCR for this superAg. Therefore, it is believed that engaging the OX-40R during tumor priming *in vivo* targets the most recently Ag-activated T cells.

It has been shown that inflammation associated with superAg stimulation and clinical signs of EAE involves the production of Th1 cytokines. It is believed that engaging the OX-40R on Th1 lines can accentuate T cell proliferation by upregulating transcription and translation of IL-2, and that effector T cells appear to be more sensitive to OX-40R specific costimulation than naive T cells. Effector T cells that have been differentiated to produce either Th1 or Th2 cytokines are both sensitive to OX-40R specific costimulation. Engaging the OX-40R on Th2 effector cells increased translation and secretion of IL-4 and IL-5 and enhanced their proliferation. Two reports recently showed that engaging the OX-40R can polarize cells to the Th2 phenotype. Our data suggest that T cell polarization is dependent on the cytokine milieu that is surrounding the T cells during differentiation and engaging the OX-40R will accentuate both a Th1 or Th2 response. It has been shown that an anti-tumor Th2 immune response does not lead to tumor eradication, but a type 1 response does. Therefore, it is expected that it will be advantageous to enhance Th1 responses during tumor priming (with IL-12, IFN-gamma, and/or anti-IL-4) in order to get optimal anti-tumor immune responses when administering reagents that engage the OX-40R *in vivo*.

OX-40L is expressed only on activated antigen presenting cells such as B cells, dendritic cells, endothelial cells, and macrophages. *In vivo* expression of the OX-40L appears to occur in highly inflammatory situations such as infection of mice with MMTV (draining LN) or in mice with EAE on macrophages isolated from the inflamed organ (brain). Even in normal primary T cell responses such as immunization with Ag in CFA OX-40L expression was quite low on spleen macrophages. The OX-40R is expressed every time a T cell is triggered through the TCR, therefore the potent OX-40R costimulatory effects might be regulated by the inaccessibility of the OX-40L on APC. The immune system has evolved to generate an immune response to clear foreign entities rapidly, and then readily downregulate itself. Since OX-40L-mediated costimulation is quite potent at the effector T cell stage, it may only be necessary in

cases where a massive invasion occurs which in turn causes a long-lasting inflammation. Aggressive tumors downregulate immune responses through immunosuppressive mechanisms, therefore the APC near the tumor site probably do not express the OX-40L. It is believed that tumor-specific immune responses were being enhanced in the experiments described above by adding a signal that engages the OX-40R *in vivo* and therefore a percentage of the tumor challenged mice were able to remain tumor-free.

In summary, in Examples 6-9 above, engaging the OX-40R during tumor priming is believed to have been effective to delay and prevent the appearance of tumors as compared to control treated mice. The OX-40R effect was dose dependent and was observed in a variety of immunogenic and non-immunogenic tumor models. OX-40R expression was found on T cells localized at the tumor site in several different human cancers (melanoma, head and neck, and breast cancer (see e.g. Fig. 9)). Examination of the physical relationship of the OX-40R<sup>+</sup> T cells to breast cancer cells in both a 1<sup>st</sup> tumor and a tumor invaded lymph node indicated that the OX-40R<sup>+</sup> T cells were concentrated in areas surrounding the tumor and it is believed that they are tumor-specific T cells. The combination of the OX-40R therapeutic data in the mouse tumor model and the appearance of OX-40R<sup>+</sup> in tumor bearing patients is believed to indicate immune tumor-reactivity can be enhanced with reagents designed engage the OX-40R in patients with cancer. The data are believed to indicate that engaging OX-40R especially for example during Ag-specific priming can be a useful adjuvant in a wide variety of vaccine settings.

The foregoing examples further illustrate the present invention, but are not limiting. Numerous variations and modifications can be made in the methods and compositions disclosed herein, and such variations and modifications are encompassed within the invention. The present disclosure also extends to combinations and subcombinations of the features mentioned and described herein. The documents referred to are hereby incorporated by reference in their entirety for all purposes.

## REFERENCES:

- Better et al. (1989) Methods in Enzymology 178: 478-496.  
 Better and Horowitz (1990) Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Immune Disease & the Immune Response (ICSU Short Report), (Strellan et al., eds.) vol. 10:105.
- Calderhead et al. (1993) J. Immunol. 151: 6281-6271.  
 Dubey et al. (1995) J. Immunol. 155: 45.  
 Glockscher et al. (1990) Biochemistry 29: 1362-1367.  
 Godfrey et al. (1994) J. Exp. Med. 180: 757-762.  
 Herliow and Lona (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (ISBN 0-87969-314-2).
- Huntzicker et al. (1995) 9th International Congress of Immunology, San Francisco, Abstract #5170-872.
- Kaye and Hedrick (1989) Nature 341:746  
 Krummel et al. (1996) J. Exp. Med. 183: 2533.  
 Latza et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 877-883.  
 Lenschow et al. (1996) Ann. Rev. Immunol. 14: 233.  
 Mellett et al. (1990) EMBO J. 9: 1083-1086.  
 Mura et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11: 1313-1325.  
 Paterson et al. (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-1290.  
 Sambrook et al. (1989). in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York.
- Vandenbark et al. (1985) J. Immunol. 135: 223.  
 Vetto et al. (1987) Am. J. Surg. 174: 258-265.  
 Walunas et al. (1996) J. Exp. Med. 183: 2541-2550.  
 Weinberg et al. (1996) Nature Medicine 2: 183-189.  
 Weinberg et al. (1994) J. Immunol. 152: 4712-4721.

## Claims:

1. Use of an OX-40 receptor binding agent, or of a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent, in the manufacture of a pharmaceutical composition for enhancing immune response against an antigen in a mammal, which is either a tumour antigen, or an antigen for which the composition is administered so as to present the OX-40 receptor binding agent to T-cells of the mammal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen.
2. Use according to claim 1 wherein the OX-40 receptor binding agent is selected from OX-40L, anti-OX-40 antibodies, and immunologically effective portions of anti-OX-40 antibodies.
3. Use according to claim 2 wherein the anti-OX-40 monoclonal antibody is a humanized monoclonal antibody.
4. Use according to claim 1, 2 or 3 wherein the antigen is selected from viral antigens, bacterial antigens and tumor antigens.
5. Use according to claim 1 wherein a purified OX-40 receptor binding agent and a pharmaceutically acceptable carrier is used in the manufacture of a pharmaceutical composition for enhancing the immune response of a mammal to an antigen by administering the composition to the mammal to present the OX-40 receptor binding agent to T-cells of the mammal during or shortly after priming of the T-cells by the antigen.
6. Use according to claim 5 wherein the OX-40 receptor binding agent is administered to the mammal about 3-7 days after administration of the antigen.
7. Use according to any preceding claim wherein said composition is for enhancing the immune response of a mammal to a tumour cell in the mammal.
8. Use according to claim 7 wherein the OX-40 receptor binding agent is selected from OX-40L, anti-OX-40 antibodies, and immunologically effective portions of anti-OX-40 antibodies.
9. Use according to claim 7 or 8 wherein the anti-OX-40 monoclonal antibody is a humanized monoclonal antibody.
10. Use according to claim 1, wherein a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of a cell in the manufacture of a composition for introducing the nucleic acid into a cell and enhancing the immunogenicity of the cell.
11. Use according to claim 10 wherein the cell is a tumor cell.
12. Use according to claim 11 wherein the nucleic acid further encodes a second protein.

13. Use according to claim 12 wherein the second protein is selected from: major histocompatibility complex proteins, cytokines, interferons and immune-system co-stimulatory molecules.

14. Use according to any of claims 10-13 wherein the nucleic acid encoding the OX-40 receptor binding agent is part of a viral or plasmid vector.

15. Use according to claim 14 wherein the viral vector is selected from adenoviruses, retroviruses and herpesviruses.

16. Use according to claim 14 or 15 wherein the viral vector is an attenuated or disabled virus.

17. Use according to claim 1, wherein a nucleic acid which encodes an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of a cell, along with tumor cells from a mammal, is used in the manufacture of a pharmaceutical composition

for stimulating the immune response of a mammal to a tumor in the mammal by (a) removing tumor cells from the mammal; (b) attenuating the removed tumor cells; (c) introducing the nucleic acid into the attenuated tumor cells; and (d) administering the thus-treated attenuated tumor cells containing the nucleic acid molecule to the mammal.

18. Use according to claim 17 wherein the OX-40 receptor binding agent is OX-40L.

19. Use according to claim 17 or 18 wherein attenuating the tumor cells is performed prior to introducing the nucleic acid molecule.

20. Use according to claim 17 or 18 wherein attenuating the tumor cells is performed after introducing the nucleic acid molecule.

21. Use according to claim 1, wherein a nucleic acid which encodes an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of a cell, along with T-cells from a mammal, is used in the manufacture of a pharmaceutical composition for enhancing the immune response of a mammal to an antigen by removing T-cells from the mammal, incubating the removed T-cells ex vivo with an OX-40 receptor binding agent, and returning the thus-treated T-cells to the mammal.

22. Use according to claim 21 wherein the OX-40 receptor binding agent is selected from OX-40L, anti-OX-40 antibodies, and immunologically effective portions of anti-OX-40 antibodies.

23. Use according to claim 21 or 22 wherein the mammal has a tumor, and the antigen is a tumor antigen.

24. Use according to claim 1 wherein an OX-40 receptor binding agent or a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent is used in the manufacture of a pharmaceutical for enhancing immune response against a tumor in a mammal by increasing the amount of OX-40 receptor binding agent at the tumor site.

25. A tumor cell that has been transformed with a nucleic acid encoding an OX-40 receptor binding agent that is localised on the surface of the cell.

26. A composition, comprising cell membranes isolated from a cell according to claim 25.

CD4+ T Cell Subset Development

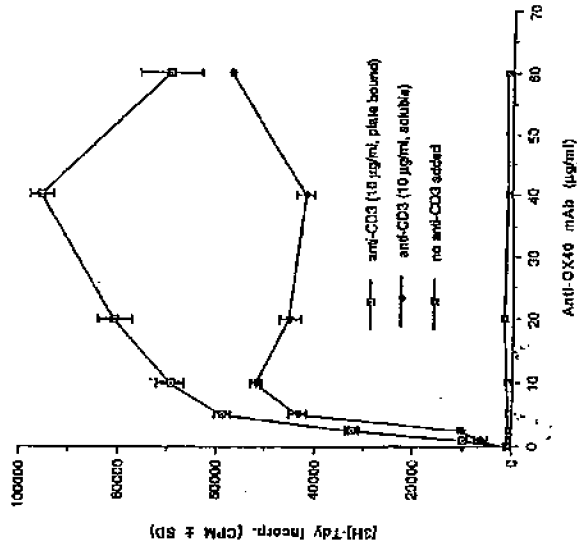
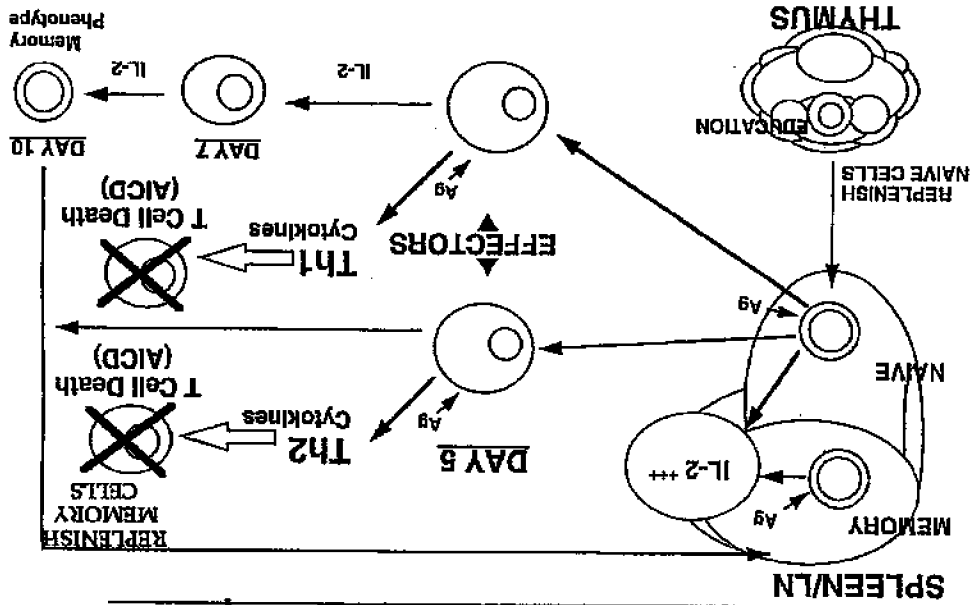


FIG. 2

FIG. 3

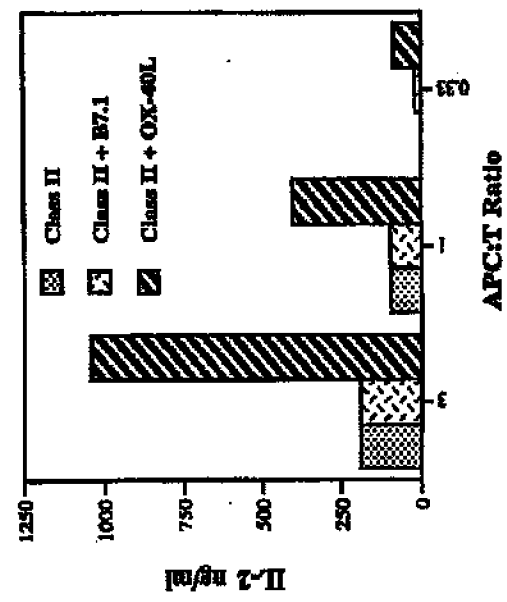
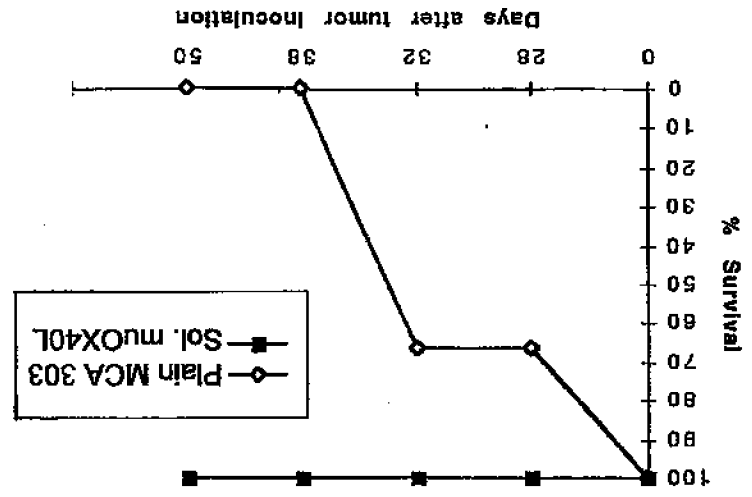


FIG. 4



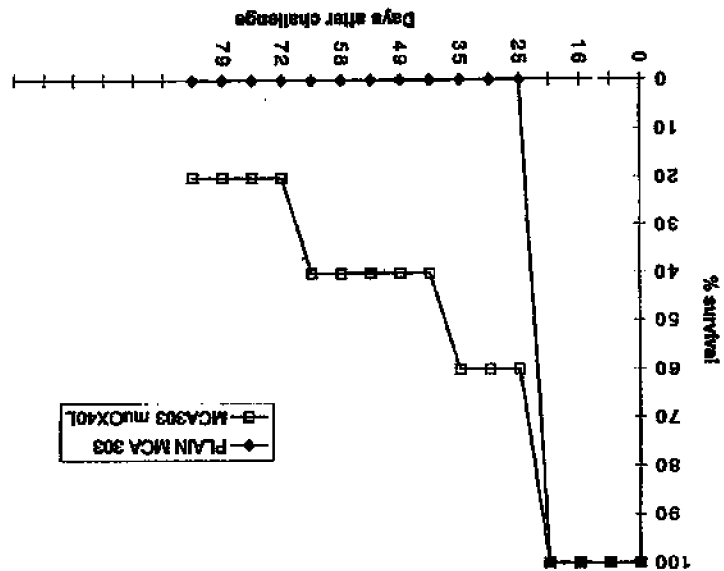


FIG. 6

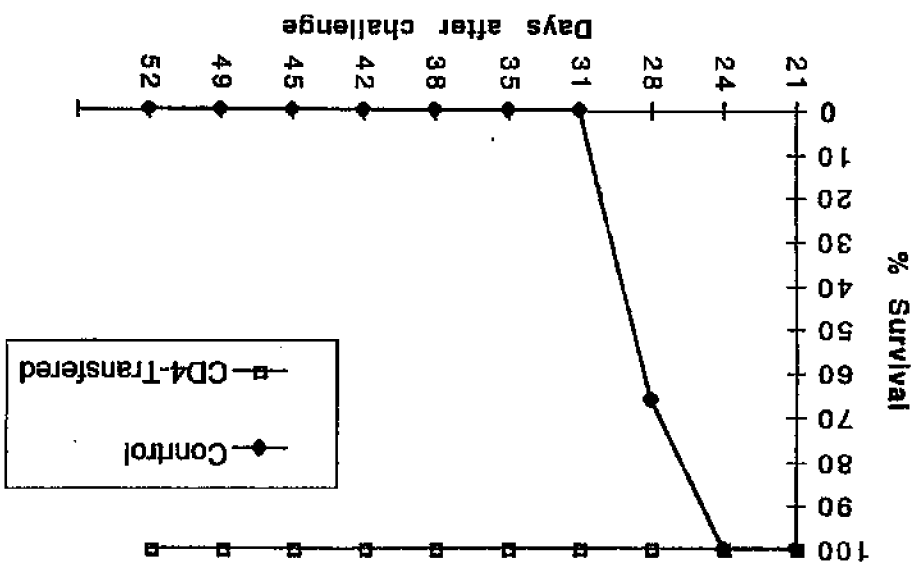
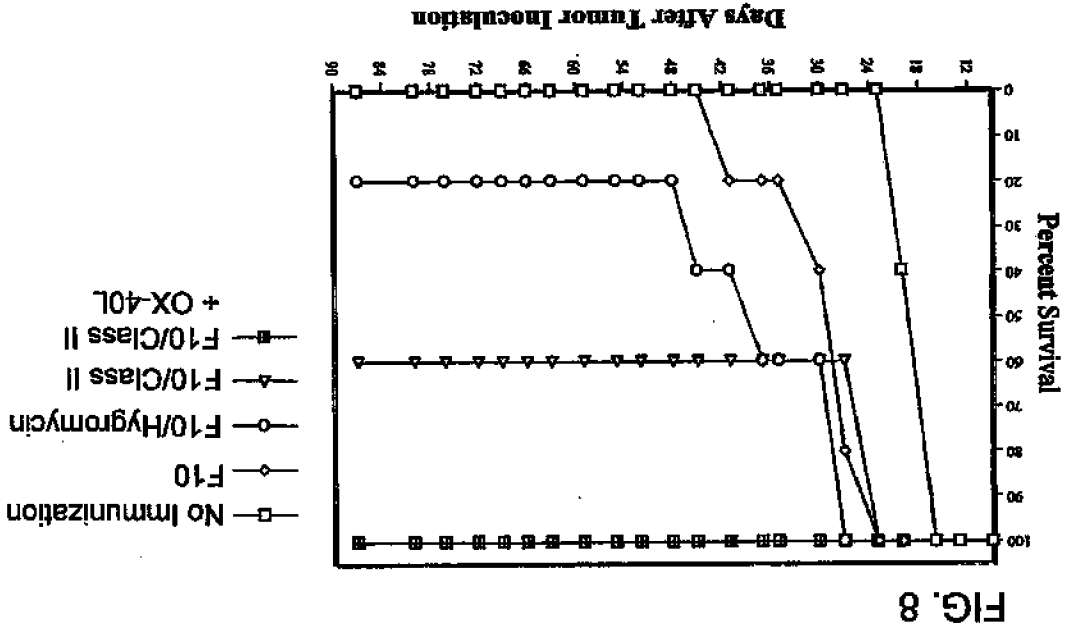
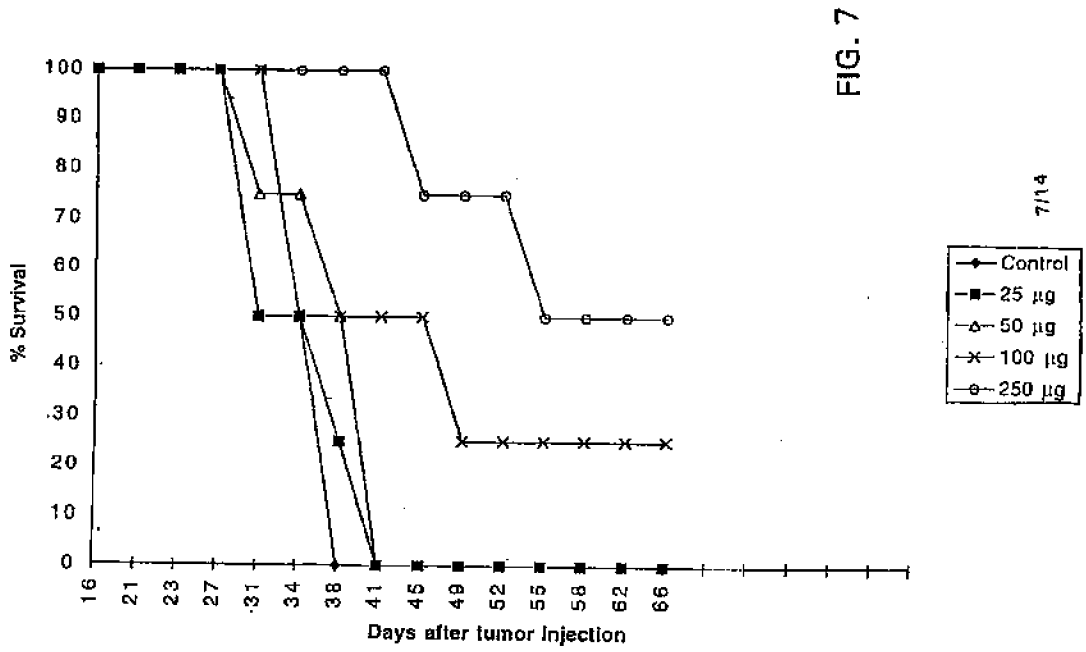


FIG. 5



PCT/US99/03908

WO 99/42585



PCT/US99/03908

WO 99/42585

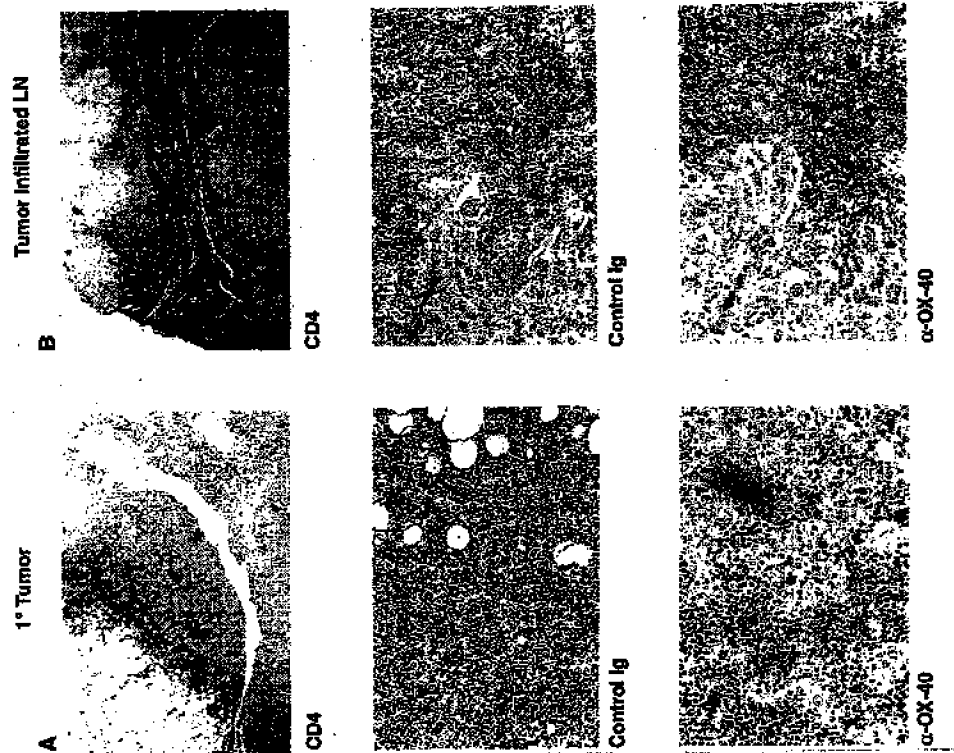


FIG. 9

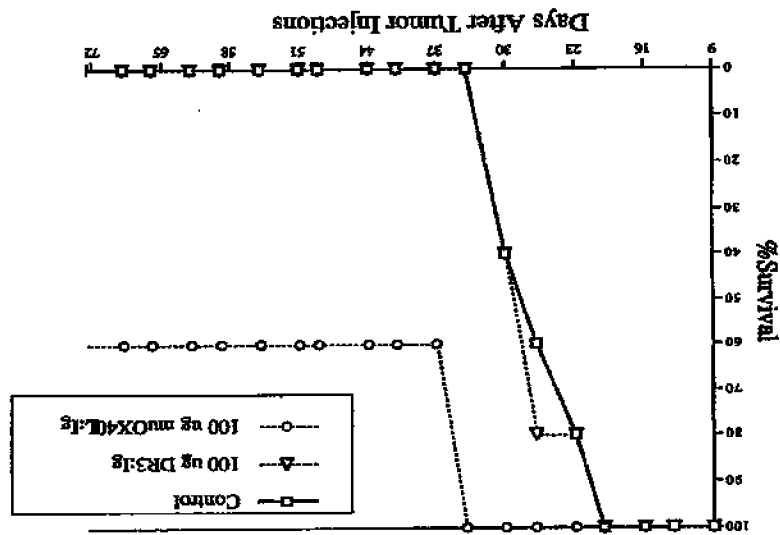


FIG. 10



FIG. 12A

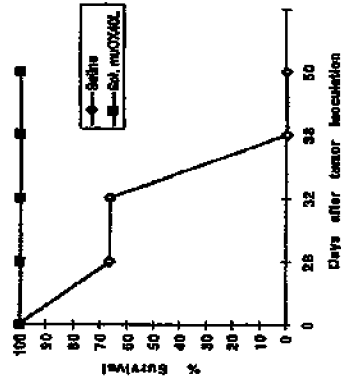


FIG. 12B

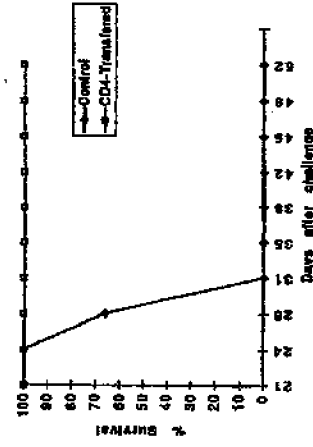


FIG. 11

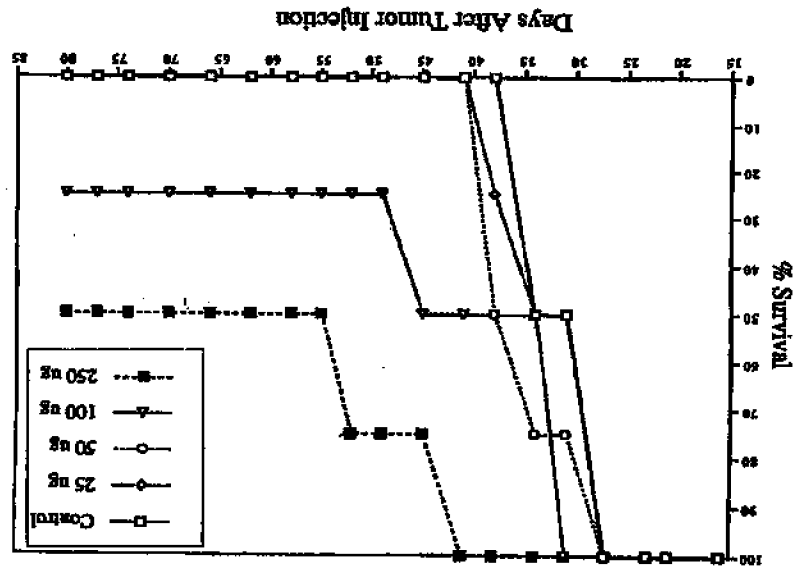


FIG. 13A

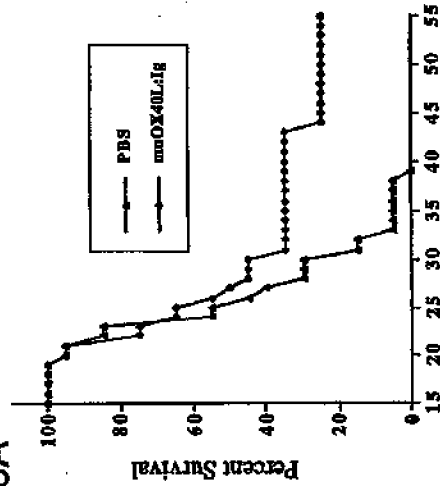
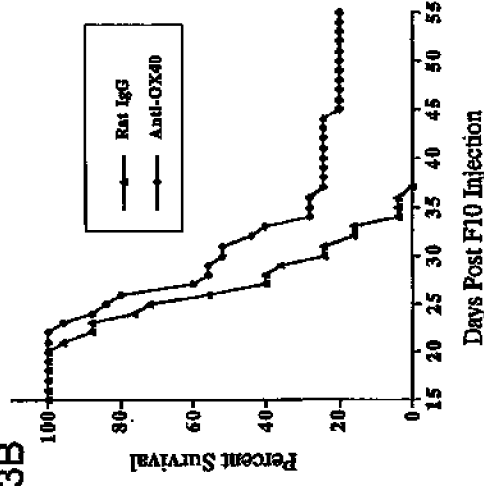


FIG. 13B



13/14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 14A

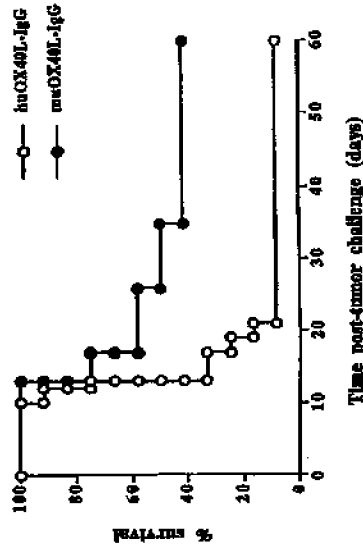
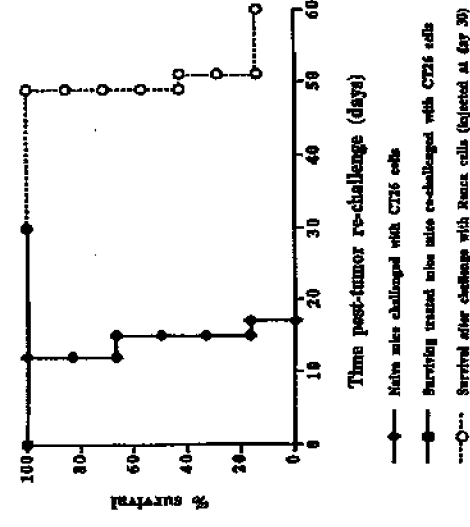


FIG. 14B



14/14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/22 A61K39/395 A61K38/16 A61K48/00		International Application No. PCT/US 99/03908	
According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
B. FIELD SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are indicated in the field searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to claim No.	
X	MORRIS, A. (1) ET AL: "Successful transfection of the OX - 40 ligand in murine and human tumor cell lines." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (1997) VOL. 38, NO. 0, PP. 401. MEETING OF THE EIGHTH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA APRIL 12-16, 1997 ISSN: XP002109413 see the whole document --/--	25	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C			
<input type="checkbox"/> Special categories of cited documents			
* "A" document defining the overall state of the art which is not prior art for the purposes of the international search			
* "B" document published prior to or after the international filing date			
* "C" document which may (know) create an priority claim or which is cited to establish the publication date of another document			
* "D" document which may (know) create an priority claim or which is cited to establish the publication date of another document			
* "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
Date of the actual completion of the international search			
16 July 1999		Date of mailing of the international search report	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5518 Palamarek 2 CH-8001 Zurich, Switzerland Tel. 41 (0) 43 240 2000 Fax 41 (0) 43 240 2010 Telex 41 31 651 500 nL Fac 41 (0) 43 240 3010		04/08/1999 Authorized officer Mennessier, T	

Form PCT/ISAR/10 (October 1997)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 99/03908		
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to claim No.
X	VEITTO, J T ET AL: "Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers." AMERICAN JOURNAL OF SURGERY, (1997 SEP) 174 (3) 258-65. JOURNAL CODE: 324. ISSN: 0002-9610. XP002109414 United States cited in the application see page 264, left-hand column see page 263 - page 264, left-hand column	25
Y	WEINBERG A D: "Antibodies to OX - 40 (CD134) can identify and eliminate autoreactive T cells: implications for human autoimmune disease." MOLECULAR MEDICINE TODAY, (1998 FEB) 4 (2) 76-83. REF: 37 JOURNAL CODE: CHM. ISSN: 1357-4310. XP002109415 ENGLAND: United Kingdom see page 81, right-hand column - page 82, left-hand column	1-26 1-26
P, X	WEINBERG A D ET AL: "OX - 40: 111e beyond the effector T cell stage." SEMINARS IN IMMUNOLOGY, (1998 DEC) 10 (6) 471-80. REF: 31 JOURNAL CODE: A61. ISSN: 1044-5323. XP002109416 United States see page 471, left-hand column see page 477 - page 479, left-hand column	1-26
P, X	MORRIS, A. (1) ET AL: "Breast cancer immunity in mice treated with the OX - 40 ligand." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (MARCH, 1998) VOL. 39, PP. 531. MEETING INFO.: 89TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH NEW ORLEANS, LOUISIANA, USA MARCH 28-APRIL 1, 1998 AMERICAN. XP002109417 see the whole document --/--	1-26

Form PCT/ISAR/10 (October 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C (Classification) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International Application No.
Category	Class of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
P, Y	GRAMAGLIA J ET AL: "Ox - 40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998 DEC 15) 161 (12) 6510-7. JOURNAL CODE: IFB, ISSN: 0022-1767.. XP002109418 United States see page 6510 - page 6513, left-hand column see page 6514, right-hand column - page 6516 -----	1-26

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-504334

(P2002-504334A)

(43) 公表日 平成14年2月12日 (2002.2.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
C 1 2 N 15/02		A 6 1 K 39/395	E 4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00			T 4 C 0 8 4
39/395		48/00	4 C 0 8 5
		A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
48/00		37/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-532525(P2000-532525)  
 (86) (22) 出願日 平成11年2月23日 (1999.2.23)  
 (85) 翻訳文提出日 平成12年8月24日 (2000.8.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US99/03908  
 (87) 国際公開番号 WO99/42585  
 (87) 国際公開日 平成11年8月26日 (1999.8.26)  
 (31) 優先権主張番号 09/028, 716  
 (32) 優先日 平成10年2月24日 (1998.2.24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

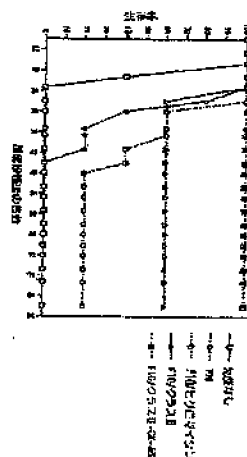
(71) 出願人 シスターズ オブ プロビデンス イン  
 オレゴン  
 アメリカ合衆国, オレゴン 97213, ポー  
 トランド, ノースイースト グリサン ス  
 トリート 4805, プロビデンス ポートラ  
 ンド メディカル センター  
 (72) 発明者 ウェインバーグ, アンドリュウ ディー.  
 アメリカ合衆国, オレゴン 97201, ポー  
 トランド, サウス ウェスト フェアマウ  
 ント プールバード 3266  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 OX-40レセプター結合因子又はそれをコードする核酸を含む組成物並びに抗原特異的免疫応答を増強するための方法

## (57) 【要約】

T-細胞の表層上のOX-40レセプターに結合することにより哺乳動物の抗原に対する免疫応答を増強するための組成物及び方法を開示し、これは精製OX-40レセプター結合因子及び医薬的に許容される担体を含んで成る組成物を哺乳動物に投与することを含んで成り、ここでこの組成物は抗原によるT-細胞のプライミングの最中又はその直後にその哺乳動物のT-細胞にOX-40レセプター結合因子が供与されるように哺乳動物に投与する。かかる組成物及び方法は免疫及び癌の治療に利用できる。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 哺乳動物における抗原に対する免疫応答を増強するための医薬組成物の製造におけるOX-40レセプター結合因子又はOX-40レセプター結合因子をコードする核酸の利用であって、ここで当該抗原は腫瘍抗原であるか、又は抗原であって、当該抗原がT細胞をプライミングせしめている間又はプライミングせしめた直後に哺乳動物のT細胞にOX-40レセプター結合因子が供与されるよう当該抗原に対して当該組成物が投与される抗原である、前記利用。

【請求項2】 前記OX-40レセプター結合因子がOX-40L、抗-OX-40抗体及び抗-OX-40抗体の免疫学的に有効な部分から選ばれる、請求項1に記載の利用。

【請求項3】 前記抗OX-40モノクローナル抗体がヒト化モノクローナル抗体である、請求項2記載の利用。

【請求項4】 前記抗原がウイルス抗原、細菌抗原及び腫瘍抗原から選ばれる、請求項1、2又は3記載の利用。

【請求項5】 抗原に対する哺乳動物の免疫応答を増強するための医薬組成物の製造において精製されたOX-40レセプター結合因子及び医薬的に許容される担体を利用する請求項1記載の利用であって、ここで当該増強は当該組成物を当該哺乳動物に投与することで、当該抗原がT細胞をプライミングせしめている間又はプライミングせしめた直後に当該哺乳動物のT細胞に当該OX-40レセプター結合因子が供与されることによるものである、請求項1記載の利用。

【請求項6】 前記OX-40レセプター結合因子が前記抗原を投与してから約3～7日後に前記哺乳動物に投与されるものである、請求項5記載の利用。

【請求項7】 前記組成物が前記哺乳動物における腫瘍細胞に対する当該哺乳動物の免疫応答を増強するためのものである、先の請求項のいずれか1項記載の利用。

【請求項8】 前記OX-40レセプター結合因子がOX-40L、抗-OX-40抗体及び抗-OX-40抗体の免疫学的に有効な部分から選ばれる、請求項7記載の利用。

【請求項9】 前記抗-OX-40モノクローナル抗体がヒト化モノクローナル抗体である、請求項7又は8記載の利用。

【請求項10】 細胞表層上に局在したOX-40レセプター結合因子をコードする核酸を、細胞の中に該核酸を導入して当該細胞の免疫原性を増強するための組成物の製造において利用する、請求項1記載の利用。

【請求項11】 前記細胞が腫瘍細胞である、請求項10記載の利用。

【請求項12】 前記核酸が第二タンパク質を更にコードする、請求項11記載の利用。

【請求項13】 前記第二タンパク質が主要組織適合性複合タンパク質、サイトカイン、インターフェロン及び免疫系補刺激分子から選ばれる、請求項12記載の利用。

【請求項14】 前記OX-40レセプター結合因子をコードする核酸がウイルス又はプラスミドベクターの一部である、請求項10～13のいずれか1項記載の利用。

【請求項15】 前記ウイルスベクターがアデノウイルス、レトロウイルス及びヘルペスウイルスから選ばれる、請求項14記載の利用。

【請求項16】 前記ウイルスベクターが弱毒化又は衰弱化ウイルスである、請求項14又は15記載の利用。

【請求項17】 細胞表層上に局在したOX-40レセプター結合因子をコードする核酸を、哺乳動物由来の腫瘍細胞と共に、哺乳動物における腫瘍に対する当該哺乳動物の免疫応答を刺激するための医薬組成物の製造において利用する請求項1記載の利用であって、ここで当該刺激は（a）当該哺乳動物から腫瘍細胞を取り出し；（b）この取り出しを腫瘍細胞を弱毒化し；（c）この弱毒化した腫瘍細胞に核酸を導入し；そして（d）当該核酸分子を含むかのようにして処理した弱毒化腫瘍細胞を前記哺乳動物に投与することによるものである、請求項1記載の利用。

【請求項18】 前記OX-40レセプター因子がOX-40Lである、請求項17記載の利用。

【請求項19】 前記腫瘍細胞の弱毒化を前記核酸分子の導入の前に実施す

る、請求項17又は18記載の利用。

【請求項20】 前記腫瘍細胞の弱毒化を前記核酸分子の導入の後に実施する、請求項17又は18記載の利用。

【請求項21】 細胞表層上に局在したOX-40レセプター結合因子をコードする核酸を、哺乳動物由来のT細胞と共に、抗原に対する哺乳動物の免疫応答を増強するための医薬組成物の製造において利用する請求項1記載の利用であって、ここで当該増強は当該哺乳動物からT細胞を取り出し；この取り出したT細胞をOX-40レセプター結合因子と*ex vivo*でインキュベーションし、そしてかのようにして処理したT細胞を前記哺乳動物にもどすことによるものである、請求項1記載の利用。

【請求項22】 前記OX-40レセプター結合因子がOX-40L、抗-OX-40抗体及び抗-OX-40抗体の免疫学的に有効な部分から選ばれる、請求項21記載の利用。

【請求項23】 前記哺乳動物が腫瘍であり、そして前記抗原が腫瘍抗原である、請求項21又は22記載の利用。

【請求項24】 哺乳動物における腫瘍に対する免疫応答を増強するための医薬組成物の製造においてOX-40レセプター結合因子又はOX-40レセプター結合因子をコードする核酸を利用する請求項1記載の利用であって、ここで当該増強は当該腫瘍部位においてのOX-40レセプター結合因子の量の増大によるものである、請求項1記載の利用。

【請求項25】 細胞表層上に局在したOX-40レセプター結合因子をコードする核酸で形質転換された腫瘍細胞。

【請求項26】 請求項25記載の細胞から単離された細胞膜を含んで成る組成物。



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は動物、特にヒト及び非ヒト動物における増強免疫応答を構築するための方法及び組成物に関連する。本発明はかかる方法において利用するための組成物及び材料、例えば関連のワクチン、細胞、プラスミド、ウィルス及びその他のベクター、並びにそれに由来する製剤の製造にも関連する。本発明のその他の観点は以下の説明により明らかとなる。

## 【0002】

## 発明の背景

様々なレセプター－リガンド相互作用が抗原に対して特異的な免疫応答の誘導、樹立及び調節に関与することで知られている。抗原に対するCD4又はCD8 T細胞応答を活性化するのに少なくとも2つのシグナルが必要である(Lenschowら、1996)。第一シグナルはT細胞レセプター(TCR)を介し、抗原提示細胞(APC)の表層上に載っている主要組織適合性(MHC)クラスI又はII分子に結合した抗原(典型的にはペプチド)により誘導される。第二シグナルはAPCの表層上にあるリガンドのT細胞の表層上の第二レセプター分子に対する結合を包含する。この第二シグナルは補刺激(co-stimulation)と呼ばれ、そしてAPCリガンドは往々にして補刺激分子と呼ばれている。最も良く特性決定されたシグナルはT細胞上のCD28レセプターとAPC上のそのリガンドB7.1又はB7.2との間の相互作用を介して誘導されるが、レセプター／補刺激分子相互作用の多種多様なその他の例も発表されている。

## 【0003】

この2つのシグナルは組合さるとT細胞を活性化し、その結果それらはサイトカインを分泌し、そして増強する。CD4 T細胞の場合、活性化細胞(CD4<sup>+</sup>と命名)はIL-2及びIFN $\gamma$ 等のサイトカインを産生し、それらは炎症部位のキラー(CD8<sup>+</sup>) T細胞を活性化する。CD4 T細胞が活性化されると、別のレセプターCTLA-4が発現される。それはCD28と相同性を有し、そしてCD28よりも強い親和力でB7分子に結合する。B7/CTLA-

4 相互作用はCD28の活性化シグナルを阻害し、そしてT細胞応答をダウンレギュレーションしうるネガティブシグナルを運搬する (Krummel ら、1996; Walunas ら、1996)。このダウンレギュレーションメカニズムは過剰な免疫系応答を、例えば炎症現象の際に産生されるサイトカインの量を減少させることにより阻害しうる。しかしながら、同時に、それは「記憶細胞」となり始めるT細胞の数もダウンレギュレーションしうる。記憶細胞の数を減らすということは、次に遭遇する同一の抗原に対して応答できる細胞の数が減るということである。しかしながら、活性T細胞を、ダウンレギュレーションするのではなく、維持することが有利である数多くの状況がある。例えば癌患者は腫瘍細胞に対する活性T細胞応答の維持により恩恵を受けるであろう。ワクチン化の概念は投与抗原を認識する記憶T細胞の集団の維持を要する。

#### 【0004】

CD4 T細胞の補刺激において役割を果たすものと提唱されている別のレセプター／リガンド組合せはOX-40レセプター／OX-40リガンドの組である。CD28レセプターはT細胞の様々なサブクラスの表層上にあるが（それらが活性化していようとしていなかろうと関係なく）、OX-40レセプター（「OX-40」）(Patersonら、1987; Calderheadら、1993)は*in vivo*では抗原活性化CD4<sup>+</sup> T細胞上にのみあることが示されている (Weinbergら、1994; 1996) かくして、OX-40は自己免疫疾患における炎症部位にある自己抗原を認識する活性化CD4<sup>+</sup> T細胞上にあり、抹消血液系にはないことが示されている (Weinbergら、1994; 1996)。OX-40は、腫瘍浸潤リンパ球、並びに頭部及び首の鱗状細胞腫瘍並びに黒色腫を有する患者から取り出した排出リンパ節細胞から単離したCD4<sup>+</sup> T細胞上に所定の割合で存在していることも示されている (Vetto ら、1997)。腫瘍壊死因子 (TNF) 超科の構成員であるOX-40リガンドは抗-CD-3抗体で活性化されたT細胞を補刺激することが示された (即ち、非抗原特異的態様で) (Godfrey ら、1999)。しかしながら、その一般的な補刺激機能の他、免疫応答経路におけるOX-40レセプター／OX-40リガンド相互作用の生物学的役割は今日まで知られていない。

#### 【0005】

## 発明の概要

本発明はその一定の観点において、選定の抗原に対する哺乳動物の免疫応答を増強且つ維持するために利用できる組成物及び方法を提供する。従来技術は一般的な免疫応答を強化することを試んできたが、本明細書において開示する組成物及び方法は特定の抗原に反応して活性化されたばかりのT細胞（いわゆる「記憶細胞」）又はかかる感作過程にあるT細胞を特異的に標的とする。詳しくは、本明細書において開示する方法の効果は記憶T細胞の数の増加、それ故特定の（選定の）抗原に対する免疫系の応答の増強を含むものと信じられている。

### 【0006】

本発明の基礎は（1）CD4<sup>+</sup> T細胞上へのOX-40レセプターの結合、特に例えば抗原によるかかる細胞のプライミングの最中、又はその直後での結合がその抗原に対するCD4<sup>+</sup> T細胞の増強された応答をもたらしうる、及び（2）この抗原に対する増強された応答がかかる結合がないときよりも実質的に長期にわたり維持されうる、という発見にある。その結果、例えばT細胞プライミングの最中に、OX-40レセプターに結合する分子の供与を介する免疫応答の増強は、感染因子、例えば細菌及びウイルス、並びに腫瘍細胞により提示される抗原のT細胞認識を増強させることにより動物の疾患に対する耐性を著しく強めうる。

### 【0007】

従って、本発明はとりわけ哺乳動物における抗原に対する免疫応答を増強するための医薬組成物の製造におけるOX-40レセプター結合因子又はOX-40レセプター結合因子をコードする核酸の利用を提供し、ここでこの抗原は腫瘍抗原であるか、又は抗原であってかかる抗原がT細胞をプライミングせしめている間又はプライミングせしめた直後に哺乳動物のT細胞にOX-40レセプター結合因子が供与されるようかかる抗原に対してかかる組成物が投与される抗原である。

### 【0008】

このOX-40レセプター結合因子はOX-40L、抗OX-40抗体（例えば、モノクローナル抗体、例えばヒト化モノクローナル抗体）及び抗OX-4

O抗体の免疫学的に有効な部分から選ばれうる。

【0009】

かかる抗原はウィルス抗原、細菌抗原及び腫瘍抗原から選ばれうる。

【0010】

更に本発明に従うと、抗原に対する哺乳動物の免疫応答を増強するための医薬組成物の製造において精製されたOX-40レセプター結合因子及び医薬的に許容される担体を利用でき、ここで当該増強は当該組成物を当該哺乳動物に投与することで、当該抗原がT細胞をプライミングせしめている間又はプライミングせしめた直後（例えば、前記抗原を投与してから約3～7日後）に当該哺乳動物のT細胞に当該OX-40レセプター結合因子が供与されることを介する。

【0011】

この技術は前記哺乳動物における腫瘍細胞に対する当該哺乳動物の免疫応答を増強するのに適用できる。

【0012】

本発明を実施する一の形態は、細胞表層上に局在した（例えば、適当なトランスメンブラン配列の保有により）OX-40レセプター結合因子をコードする核酸の、細胞（例えば腫瘍細胞）の中に該核酸を導入して当該細胞の免疫原性を増強するための組成物の製造における利用を介する。

【0013】

前記核酸は所望するなら第二タンパク質を更にコードしてよく、それは例えば主要組織適合性複合タンパク質、サイトカイン、インターフェロン及び免疫系補刺激分子から選ばれる。

【0014】

前記OX-40レセプター結合因子をコードする核酸はウィルス又はプラスミドベクター、例えばアデノウィルス、レトロウィルス又は及びヘルペスウィルスの一部であってよい。

このウィルスベクターは弱毒化又は衰弱化ウィルスであってよい。

【0015】

本発明の更なる観点に従うと、細胞表層上に局在したOX-40レセプター結

合因子をコードする核酸は、哺乳動物由来の腫瘍細胞と共に、哺乳動物における腫瘍に対する当該哺乳動物の免疫応答を刺激するための医薬組成物の製造において利用でき、ここで当該刺激は（a）当該哺乳動物から腫瘍細胞を取り出し；（b）この取り出しを腫瘍細胞を弱毒化し；（c）この弱毒化した腫瘍細胞に核酸を導入し；そして（d）当該核酸分子を含むかのようにして処理した弱毒化腫瘍細胞を前記哺乳動物に投与することによるものである。この観点においてかかるOX-40レセプター因子はOX-40Lであってよい。この腫瘍細胞の弱毒化は前記核酸分子の導入の前又は後であってよい。

#### 【0016】

本発明を実施する別の態様は、細胞表層上に局在したOX-40レセプター結合因子をコードする核酸を、哺乳動物由来のT細胞と共に、抗原に対する哺乳動物の免疫応答を増強するための医薬組成物の製造において利用することにあり、ここで当該増強は当該哺乳動物からT細胞を取り出し；この取り出したT細胞をOX-40レセプター結合因子と*ex vivo*でインキュベーションし、そしてかのようにして処理したT細胞を前記哺乳動物にもどすことによるものである。ここでも、この哺乳動物は腫瘍を有してよく、そしてこの抗原は腫瘍抗原であってよい。

#### 【0017】

より一般的には、哺乳動物における腫瘍に対する免疫応答を増強するための医薬組成物の製造においてOX-40レセプター結合因子又はOX-40レセプター結合因子をコードする核酸が利用でき、ここで当該増強は当該腫瘍部位においてのOX-40レセプター結合因子の量の増大によるものである。

#### 【0018】

本発明は別の観点において、とりわけ細胞の表層上に局在したOX-40レセプター結合因子をコードする核酸で形質転換された腫瘍細胞、及びかかる細胞から単離された膜を含んで成る組成物を提供する。

#### 【0019】

本発明は更に本明細書に記載の特徴及び目的を有する組成物、並びにかかる組成物を作る及び使用する方法を提供する。

## 【0020】

本発明の一例において、本来100%の致死率をもたらす所定の腫瘍細胞の動物への投与との対比において、OX-40レセプターに結合する分子の腫瘍細胞と一緒に投与は、この動物を腫瘍細胞から保護した。

## 【0021】

何ら理論に拘束されるわけでもないが、この発見の基礎となるメカニズムの一つの考えられる解釈を添付図1に示す。図1は免疫系におけるCD4 T細胞の役割を示す。脾臓又はリンパ節内のナイーブT細胞（即ち、抗原にまだ曝露されていないもの）は抗原に应答して活性化細胞（「エフェクター」）へと分化する。前述の通り、この活性化はMHC分子との関係で抗原の提示を、補刺激分子と共に要する。今日までに特性決定された補刺激分子、例えばB7分子はナイーブ/エフェクター細胞遷移において作用するものと信じられている。活性化の後、このようなエフェクター細胞の大部分がサイトカインを産生し、そして所定のT細胞レセプター/リガンド相互作用（例えばCTLA-4/B7）が関与しうるフィードバックメカニズムを介し、その後予定細胞死に至るものと提唱されている。T細胞の残りの部分は増殖し、そして記憶細胞となり、抗原に対する将来の曝露に应答するよう用意されるようになる。この間のOX-40レセプターの結合によるT細胞の補刺激はエフェクターT細胞機能を増強し、そして更に初期抗原曝露後に残っており、そして最終的に記憶表現型を帯びる抗原特異的活性化CD4<sup>+</sup> T細胞の割合を高めるものと信じられている。かくして、ナイーブ/エフェクター細胞遷移において作用する慣用の補刺激分子とは対照的に、OX-40リガンドはエフェクター/記憶細胞遷移において作用する。従って、OX-40の結合を包含する本発明の方法は記憶細胞へと進行するエフェクター細胞の比率を高めることを担う。この細胞集団の増加により、その特異的な抗原に应答する免疫系の現状及び将来の能力は高まり、そしてこの高まった応答能力は顕著に長い期間維持される。対照的に、補刺激分子を供与することにより免疫応答を増強する従来発表された方法はナイーブ/エフェクター細胞遷移において作用する補刺激分子、例えばB7を利用する（例えば、ヨーロッパ特許出願EP0733373（Bristol Myers Squibb : L Chen ら : Composition and meth

ods for increasing the immunogenicity of tumor cells by administration of B7 and CD2-transfected cells) 参照のこと)。初期免疫応答の増強は開示されているが、抗原特異的記憶細胞の集団の増大は今までに開示されていないと信じられている。ここに記載する免疫応答を増強するための方法は抗原特異的記憶T細胞の集団を増強することにより免疫応答の良好な増強を供することができるものと信じられている。

#### 【0022】

これはここに開示し、請求する本発明について一の考えられる解釈にすぎないことを強調しておく。実際のメカニズムと関係なく、抗原活性化の際にOX-40レセプターに結合する分子の投与をここに提供し、そしてこれは有意義な免疫学的利点を供しうる。

#### 【0023】

OX-40レセプターに結合できる分子をここでOX-40レセプター結合因子と呼ぶ。

#### 【0024】

かくして、一の観点において、本発明は抗原に対するCD4<sup>+</sup> T細胞により媒介される免疫応答を誘導する又は増強する方法を提供し、それは抗原プライミングが*in vivo*で起きている最中又はその直後に、CD4<sup>+</sup> T細胞をOX-40レセプター結合因子に導入することを含んで成る。OX-40レセプター結合因子及び適当な担体を含んで成るかかる方法に利用するための組成物も提供する。

#### 【0025】

本発明において有用なOX-40レセプター結合因子にはOX-40リガンド、OX-40リガンドの機能性ドメイン、例えば単独又は他のペプチドドメインに接合した細胞外ドメイン、例えば融合タンパク質、及び抗OX-40レセプター特異性を有する抗体が挙げられる。

#### 【0026】

かかるOX-40レセプター結合因子はウィルス抗原、細菌抗原及び腫瘍抗原等の多種多様な抗原に対するCD4<sup>+</sup> T細胞媒介免疫応答を誘導又は増強する

のに利用できる。本発明の一の観点において、OX-40レセプター結合因子は抗原に対する動物の免疫応答を増強するために利用できる。

#### 【0027】

かくして、本発明は更に抗原に対する動物の免疫応答を増強するための方法を提供し、この方法はかかる動物に精製されたOX-40レセプター結合因子及び医薬的に許容される担体を含んで成る組成物を投与することを含んで成り、ここでかかる組成物はその動物を、OX-40レセプター結合因子が抗原によるT細胞のプライミングの最中又はその直後に哺乳動物のT細胞に供与されるようにする。哺乳動物における抗原によるT細胞プライミングの過程は抗原を導入して約3～7日後以内に行われると考えられる。かくして「プライミングの直後」とは抗原を投与してから約3～10日の期間を一般に意味する。

#### 【0028】

本発明の更なる観点に従うと、OX-40レセプター結合因子は哺乳動物に、例えば抗原調製品の投与の約10日後、より典型的には約1週間後、下記好ましくは約3～7日後に、投与抗原に対する哺乳動物のCD4<sup>+</sup> T細胞媒介免疫応答を増強するために投与されうる。正確な時期は往々にしてあまり厳格でないと信じられる。

#### 【0029】

本発明は腫瘍に対する哺乳動物の免疫応答を増強する方法も提供する。一のかかる方法において、腫瘍に対する哺乳動物の免疫応答は、この哺乳動物への治療的有効量の精製OX-40レセプター結合因子の投与により刺激される。

#### 【0030】

本発明に包括されるワクチン組成物は1又は複数種の抗原及び治療的に有効な量のOX-40レセプター結合因子を含む。前述の通り、この抗原は腫瘍抗原、細菌抗原及びウィルス抗原から成る群から選ばれうる。ワクチンがウィルス抗原を含み、そしてそのウィルス抗原が弱毒化又は複製欠陥ウィルスを介して導入されるものである場合、このOX-40レセプター結合因子はウィルスゲノムの中に挿入されたかかる因子をコードする核酸分子により供されてよく、かくしてそれはワクチンの導入された哺乳動物の細胞の中で発現される。このワクチンが弱



毒化細菌又は細菌抗原を介して導入される細菌抗原を含むなら、このOX-40レセプター結合因子はそれをコードする核酸分子を介して供されてよく、ここでこの核酸分子は細菌細胞の中に收容され、その中で発現されるものである。同様に、ワクチンが腫瘍抗原調製品、例えば腫瘍細胞膜を含む場合、OX-40レセプター結合因子はそれをコードする核酸分子を介して供与されてよく、かかる核酸分子はワクチン調製用の細胞の破裂前に腫瘍細胞内で発現される。抗原及びOX-40レセプター結合因子を供与する材料は別々に、又は一緒に導入してよい。プライミングの直後と言及している時間は生理学的に有効な接触を意味しており、かかる接触は物理的な投与の後、特に投与されたものがOX-40レセプター結合因子を*in vivo*で間接的に供与するようなものである場合、例えば上記の核酸の場合、起こりうる。

#### 【0031】

本発明の更なる観点は細胞、例えば抗原提示細胞（APC）、例えば腫瘍細胞内でのOX-40レセプター結合因子の発現の供与又は増強である。APC内でのOX-40レセプター結合因子の発現は当該因子をコードする核酸配列を担持するベクターをこの細胞に導入することにより達成され、ここでこの核酸配列の発現は、ベクターを欠く同等の細胞内での発現よりも高いかかる因子の発現レベルを供する。OX-40レセプター結合因子を導入及び発現するために適当なベクターは当業界において周知であり、そしてプラスミドベクター及びウィルスベクター、例えばアデノウィルス、ヘルペスウィルス及びレトロウィルスベクターが挙げられる。所定の態様において、このベクターは対応の免疫応答が所望される抗原をコードする1又は複数の追加の核酸配列を担持しうる。かくして、本発明の一の観点は細胞の免疫原性を増強するための方法であり、この方法は細胞にOX-40レセプター結合因子をコードする核酸分子を導入して、OX-40レセプター結合因子を細胞の表層上で発現させることを含んで成る。

#### 【0032】

本発明の別の態様において、APCは哺乳動物被検体から取り出された腫瘍細胞であってよい。これに関し、本発明は体内に存在する腫瘍細胞に対する哺乳動物の免疫応答を増強するために有用である。本発明の一の態様において、腫瘍細胞

胞は哺乳動物から取り出す。次いでOX-40レセプター結合因子を発現するベクターをこの取り出した細胞に導入し、その後それを哺乳動物にもどす。好ましくは、この腫瘍細胞は患者への再導入の前に弱毒化しておく。腫瘍細胞を弱毒化するためのメカニズムは周知であり、そして例えば照射が挙げられる。この手順の結果は、この再導入された弱毒化腫瘍細胞が腫瘍抗原及びOX-40レセプター結合因子の双方を同時にCD4<sup>+</sup>T細胞に供与することにより、その結果哺乳動物の体内の腫瘍細胞に対するCD4<sup>+</sup>T細胞媒介免疫応答は増強される。所定の腫瘍細胞は抗原提示MHC分子の発現をダウンレギュレーションすることにより身体の免疫系をかくぐるため、この取り出した腫瘍細胞の中にOX-40レセプター結合因子を発現するベクターだけを導入するのではなく、MHC分子、好ましくはMHCクラスII分子を発現するベクターも導入するのが好都合でありうる。本発明の所定の態様において、OX-40レセプター結合因子とMHC分子の双方を発現する単独ベクターを腫瘍細胞に導入してよい。かくして、本発明の別の観点において、哺乳動物における腫瘍に対する哺乳動物の免疫応答を刺激するための方法を提供し、ここでこの方法は（a）哺乳動物から腫瘍細胞を取り出し；（b）この取り出した腫瘍細胞を弱毒化し；（c）この弱毒化した腫瘍細胞にOX-40レセプター結合因子をコードする核酸分子を導入してOX-40レセプター結合因子をこの弱毒化腫瘍細胞の表層上で発現させ；そして（d）この哺乳動物にかかる核酸を含む弱毒化腫瘍細胞の調製品を治療的有効量で投与することを含んで成る。

### 【0033】

本発明は更に養子免疫療法の新規の方法を提供し、それにおいては抗原に対する哺乳動物の免疫応答を、その哺乳動物からT細胞を取り出し、その取り出したT細胞を*ex vivo*でOX-40レセプター結合因子とインキュベーションし、そしてそのT細胞を哺乳動物にもどすことにより増強させる。かかる方法は腫瘍に対する動物の免疫応答を増強するための方法も提供し、この方法は腫瘍部位（即ち、腫瘍を含む及び腫瘍に隣接する身体部）でのOX-40レセプター結合因子の量を増加させることを含んで成る。OX-40レセプター結合因子の量の増加はこの腫瘍部位にOX-40レセプター結合因子及びこのOX-4

Oレセプター結合因子をコードする核酸分子から成る群から選ばれる組成物を投与することにより達成し得る。

#### 【0034】

本発明を以下の説明、添付図及び実施例により例示しながら更に説明する。

#### 【0035】

##### 詳細な記載

##### 1. 定義

本明細書に記載される本発明の考察及び理解を容易にするために、以下の用語の定義を供する：

OX-4 Oレセプター：抗原活性化哺乳動物CD4<sup>+</sup> T細胞の表層上で発現される（ACF<sup>4</sup> 及びACT35とも多様に呼ばれる）タンパク質（Weinbergら、1994, 1996；W095/12673（Stanford Univ & Becton Dickinson：W Godfrey ら）；Latza ら、1994）。マウス、ラット及びヒトOX-4 Oレセプター相同体をコードするDNA配列はクローニングされ、配列決定されている（Malletら、1990；Calderheadら、1993；Latza ら、1994；W095/12673（前掲））。

#### 【0036】

OX-4 Oリガンド：OX-4 Oレセプターと特異的に相互作用する（抗原提示細胞（“APCs”）のような）特定の哺乳動物細胞の表層上で発現される（gp34及びACT-4-Lとも多様に呼ばれる）タンパク質（その機能でなくタンパク質自体はMiura ら、1991に記載され；W095/21915（Stanford Univ：Godfrey ら）は、名称ACT-4-Lを用いて、ヒトタンパク質及びその機能を同定しており；そして米国特許第5, 457, 035号（Immune：PR Baum ら）は対応する機能のネズミタンパク質を記載する）。マウス及びヒトからのOX-4 Oリガンドをコードする遺伝子はクローニングされ、同定されている（米国特許第5, 457, 035号（前掲）；Miura ら、1991, Godfrey ら、1994）。OX-4 Oリガンドは、細胞内、トランスメンブラン及び細胞外ドメインを含み；OX-4 Oリガンドの機能的に活性を可溶化型（“可溶性OX-4 Oリガンド”）は、米国特許第5, 457, 035及びW095/21915に記載されるように、細胞内及びトランスメンブランドメインを削除することによって作り出す

ことができる。OX-40リガンドの機能的に活性な型は、OX-40レセプターに特異的に結合する能力を保持する形態であり；OX-40リガンド分子又は誘導体がOX-40レセプターに特異的に結合する能力を決定する方法が以下に議論される。OX-40リガンド及びその誘導体を作る及び用いる方法はWO95/21915（前掲）に記載されており、それは、培養細胞からのOX-40リガンドの精製を容易にするため又は哺乳動物への生体内投与後の分子の安定性を増加させるために作り出すことができる、ヒトIgFc領域のような他のペプチドに結合したOX-40リガンドの可溶化型を含むタンパク質も記載する（米国特許第5,457,035号も参照のこと）。

#### 【0037】

本明細書に用いる場合、用語“OX-40L”は、全体のOX-40リガンド、可溶性OX-40リガンド、及び第2のタンパク質ドメインに共有結合したOX-40リガンドの機能的に活性な部分を含む融合タンパク質を含む。天然のOX-40リガンド分子からアミノ酸配列において変化しているがOX-40レセプターに特異的に結合する能力を保持するOX-40リガンド変異体もOX-40Lの定義に含まれる。このような変異体は米国特許第5,457,035号及びWO95/21915（前掲）に記載される。

#### 【0038】

OX-40レセプター結合因子：抗原活性化哺乳動物T細胞、例えば活性化CD4<sup>+</sup>T細胞の表層上に存在するOX-40抗原にのみ実質的に結合する因子。本明細書に用いる場合、用語“OX-40レセプター結合因子”は、抗OX-40抗体及びOX-40Lを含む。

#### 【0039】

用語“抗OX-40抗体”は、OX-40に特異的であるモノクローナル及びポリクローナル抗体、即ち以下に記載の方法を用いて評価した時にOX-40にのみ実質的に結合するもの、及びその免疫学的に有効な部分（“フラグメント”）を包含する。好ましくは、本発明に用いる抗OX-40抗体は、モノクローナル抗体（又はその免疫学的に有効な部分）及び好ましくはヒト化モノクローナル抗体（又はその免疫学的に有効な部分）である。モノクローナル抗体の免疫学的

に有効な部分には、Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fabc及びFv部分がある(報告について、Better及びHorowitz, 1989を参照のこと)。本発明において、モノクローナル抗体の免疫学的に有効な部分は、好ましくは、重鎖ドメインを含む部分である。抗OX-40モノクローナル抗体のヒト化型及び抗OX-40抗体の免疫学的に有効な部分は、このような抗体を生産するために用いることができる方法と共に、WO95/12673及びWO95/21915(前掲)に記載される。抗OX-40抗体は、いくつかの情報源、例えば“Antibodies, A Laboratory Manual” by Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)に記載される標準的な手順を用いて生産することもできる。

#### 【0040】

ヒト化モノクローナル抗体を作る方法は公知であり、例えば、米国特許5,585,089 (Protein Design: CL Queenら; “Humanized Immunoglobulins”), 5,565,332 (“Production of Chimeric Antibodies—A Combinatorial Approach”), 5,225,539 (Med Res Council: GP Winter; “Recombinant Altered Antibodies And Methods Of Making Altered Antibodies”), 5,693,761-762 (Protein Design: CL Queenら; “Polynucleotides Encoding Improved Humanized Immunoglobulins”, and “Humanized Immunoglobulins”), 及び5,530,101 (Protein Design: CL Queen et al.; “Humanized Immunoglobulins”), 並びにそれらの引用文献に記載されるものがある。

#### 【0041】

同様に、抗体フラグメントとも呼ぶ、モノクローナル抗体の免疫学的に有効な部分を作り出しそれを用いる方法は公知であり、例えば、Better及びHorowitz (1989) (“Expression of Engineered Antibodies and Antibody Fragments in Microorganisms”); Betterら(1990) (“Production and Scale-Up of Chimeric Fab Fragments from Bacteria”); Glockshuberら(1990) (“A Comparison of Strategies to Stabilize Immunoglobulin Fv Fragments”); 及び米国特許Nos. 5,648,237 (Genentech: PJ Carter; “Expression of Functional Antibody Fragments”), 4,946,778 (Genex: RC Ladnerら “Single Polypeptide Chain Binding Molecules”), 及び5,455,030 (Enzon: RC Ladnerら; “Immuno

therapy Using Single Chain Polypeptide Binding Molecules”）、並びにそれらの引用文献に記載されるものがある。

#### 【0042】

完全なOX-40L分子、可溶性OX-40L、及び例えばOX-40Lの細胞外ドメインが第2のタンパク質ドメインに共有結合している融合タンパク質を含む、OX-40Lの種々の製剤を本発明におけるOX-40レセプター結合剤として用いることができる。第2のタンパク質ドメインは、OX-40Lの活性を増強すること、精製を容易にすること、又は体内でのタンパク質の安定性を増加させることを含む、いくつかの機能を供し得る。このような融合タンパク質において、OX-40L、好ましくは細胞外ドメインもしくはその活性フラグメント又はこのようなドメインもしくはフラグメントの突然変異タンパク質は、治療すべき被検体の適切に選択された血液タンパク質に対応する血液タンパク質又はフラグメントのような適切に選択されたタンパク質に融合される。以下の特定の例は、OX-40L細胞外ドメインとヒトIgGの定常ドメイン、特にIgGのCH2及びCH3ドメインであるポリペプチドとの間の融合物に関する。好ましくは、このような融合物は、好ましくはいずれのシステイン残基もアラニン又はグリシンのような非硫黄アミノ酸残基に変異されているIgGのヒンジ領域に対応するヒンジアミノ酸配列領域を含むであろう。任意にスペーサー配列が介在して、IgG部分配列のC末端から融合タンパク質内で、OX-40L部分配列のN末端が続くことが好ましい。その反対の配置も有用であり得、本発明の範囲に包含される。融合パートナーの別の例は、IgGのCH2及びCH3領域のかわりのCD4配列のドメイン3及び4の使用に関する。このような融合タンパク質は、いずれかの適切な異種発現系において作ることができ、適切には、その融合タンパク質をコードするDNAは、そのDNAが分泌シグナル及び開裂配列を最初に含むが、後にこのような補助的配列を含まずに細胞の外に輸送されるタンパク質に翻訳されるように、用いる宿主細胞系に適した周知の分泌シグナル配列もコードし得る。

#### 【0043】

OX-40Lの組換え型の例は、OX-40Lの細胞外ドメインがヒトIgG

の重鎖に融合しているOX-40L:HuFcIgGである。このような融合タンパク質の生産は米国特許第5,457,035号に記載される。例えば、以下の実験に用いるOX-40L:HuFcIgG融合物は以下の通り生産した。融合タンパク質OX40L:huFcIgGを、G418選択及び周知のpGEM-Tクローニングベクターシステムを用いて、公知のCHO細胞発現系において発現させた。CHO細胞発現システムに適した分泌シグナルを含むリーダー配列を、合成オリゴヌクレオチドを用いて作製し、アニーリングして連結させ、約90bpのフラグメントを形成した。アセンブリーの後、アガロースゲルからDNAを切り出し、特定のプライマーを用いてPCR反応で増幅し、末端にHindIII及びXhoI部位を形成した。次に、リーダーをpGEM-Tクローニングベクターにクローニングしてリーダー配列を含む産物ベクターを形成した。そのリーダー配列は、シグナルペプチドの開裂のための部位を供するための抗体重鎖配列由来の7アミノ酸残基をコードする塩基を更に含んだ。ヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含むヒトIgG1遺伝子(cDNA)由来のサブ配列を、5'及び3'端への各々XhoI及びPstI部位の導入と共にPCRでクローニングし、リーダー及びヒトOX40L配列に連結させた。pGEM-Tへのクローニングの後、XhoI-PstIフラグメントを単離し、(ベクターをXhoI及びPstIで消化した後の)上述のリーダー配列を含むベクターに連結し、リーダー配列及びヒンジ-CH2-CH3領域を含む更なる結果ベクターを形成した。ヒトOX40L遺伝子の細胞外ドメインを5'及び3'末端への各々のPstI及びHindIII部位の導入を伴い、PCRでクローニングし、クローニングベクターpGEM-Tに連結した。PstIのみでの消化がOX40L及び3'末端のポリリンカー配列を遊離させるように、正しい方向のクローンを選択した。次にこのフラグメントを先の結果ベクターのPstI部位に連結し、それにより要求されるリーダー-IgG-OX40L融合構成物をコードするベクターを形成した。次に、その遺伝子構成物をHindIIIフラグメントとして単離し、発現を駆動するためのhCMVプロモーター及びmeoR選択マーカーを含む発現ベクターに移した。正しい方向の挿入物についてクローンをスクリーニングし、次にトランスフェクションのために増殖させた。この構成物を用いてCHO細胞

胞にトランスフェクトし、陽性CHOクローンをG418を用いて選択し；融合タンパク質分泌を、OX40をトランスフェクトしたSp210骨髓腫細胞との上清のインキュベーション及びフローサイトメトリー分析による結合の検出により検出した。高レベル分泌細胞をふくらませ（bulk up）、その上清からの融合タンパク質をプロテインG-Sepharoseカラムで精製した。溶出した材料をSDS-PAGE（12%）ゲルに走らせ、そのゲルをクーマシーブルーで染色して純度を確認した。ヒトOX-40配列（‘ACT-4-h-1’）についてはWO95/12673を参照のこと。ヒトOX-40L配列（‘ACT-4-h-1-L’）についてはWO95/21915及びそこで引用される文献を参照のこと。OX-40レセプター結合因子に有効に融合させることができる他のペプチドには、可溶性MHCクラスII分子、他の補刺激分子、例えばB7.1及びB7.2、並びにT細胞増強性サイトカイン、例えばIL-2がある。

特定の因子がOX-40レセプターにのみ結合することの測定は、慣用的な方法を用いて、又はそれらを適合させることにより直ちに行うことができる。in vitroアッセイに適したものは、（Harlow及びLaneによる“Antibodies, A Laboratory Manual”を含む、多くの標準的文献に記載される）ウエスタン・ブロッティング法を利用する。所定のOX-40レセプター結合因子、例えば可溶性OX-40Lの選択されたフラグメントがヒトOX-40タンパク質にのみ実質的に結合することを決定するために、全細胞タンパク質は、OX-40抗原を発現しないヒト細胞、例えばOX-40をコードする核酸分子で形質転換された非リンパ球細胞（例えばCOS細胞又はCHO細胞）から抽出される。陰性対照として、全細胞タンパク質は、対応する非形質転換細胞からも抽出される。次に、これらのタンパク質調製物は非変性ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動される。その後、タンパク質はウエスタン・ブロッティングにより、膜（例えばニトロセルロース）に移され、そしてテストすべき因子がその膜と一緒にインキュベートされる。その膜を洗って非特異的に結合した因子を除去した後、結合した因子の存在は、検出剤、例えば酵素アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたテスト因子に対して生じた抗体の使用により検出され；基質5-ブromo-4-



クロロ-3-インドリルホスフェートノニトロブルーテトラゾリウム適用は免疫局在化アルカリホスファターゼによる濃い青色の化合物の生産を引き起こす。ヒトOX-40にのみ実質的に結合する因子は、この技術により、OX-40で形質転換された細胞からの抽出物中の（その分子量により決定されるゲル上の所定の位置に局在化するであろう）ヒトOX-40バンドに結合することが示されるであろうが、非形質転換細胞からの抽出物中では結合はほとんど又は全く観察されないであろう。その因子の他のタンパク質への非特異的結合が発生し得、ウエスタンブロット上で弱いシグナルとして検出され得る。この結合の非特異的性質は、特定の因子/ヒトOX-40タンパク質結合から生ずる強力な第1のシグナルに対するウエスタン・ブロット上で得られる弱いシグナルにより、当業者に認識されるであろう。理想的には、OX-40レセプター結合因子は、非形質転換細胞から抽出されたタンパク質に結合しないであろう。

#### 【0044】

抽出されたタンパク質を用いる結合アッセイに加えて、OX-40レセプター結合因子と予想される因子は、その因子を蛍光タグ（例えばFITC）にコンジュゲートさせ、蛍光活性化セルソーター（FACS）により抗原活性化CD4<sup>+</sup>T細胞及び非活性化T細胞への結合を分析することにより、生体内で実質的にOX-40レセプターのみに結合する能力を確認するためにテストされる。実質的にOX-40レセプターのみに結合する因子は、活性化CD4<sup>+</sup>T細胞のみを染色するであろう。

#### 【0045】

形質転換：形質転換された細胞は、分子生物学技術により核酸分子が導入されている細胞である。本明細書に用いる場合、形質転換との用語は、ウイルスベクターでのトランスフェクション、プラスミドベクターでの形質転換、並びにエレクトロポレーション、リポフェクション、及びパーティクルガンアクセラレーションによる裸のDNAの導入を含む、核酸分子を細胞に導入し得る全ての技術を包含する。

#### 【0046】

単離：（核酸又はタンパク質のような）“単離された”生物学的成分は、その

成分が天然で存在する生物の細胞中の他の生物学的成分、即ち他の染色体及び染色体外DNA及びRNA、並びにタンパク質から実質的に分離され又は精製されている。これにより、“単離”されている核酸及びタンパク質は、標準的な精製法により精製された核酸及びタンパク質を含む。その用語は、宿主細胞内で組換え発現により調製された核酸及びタンパク質並びに化学的に合成された核酸も包含する。

#### 【0047】

精製：精製との用語は絶対純度を要求せず；むしろ相対的用語として解釈する。これにより例えば、精製されたOX-40リガンド調製物は、OX-40リガンドが細胞内でその天然の環境にあるリガンドより高純度であるものである。好ましくは、OX-40リガンドの調製物は、OX-40リガンドタンパク質が調製物の全タンパク質成分の少なくとも50%を示すように精製される。

#### 【0048】

作用可能に結合（連結）：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係をもって配置される時に、その第1の核酸配列は第2の核酸配列に作用可能に結合している。例えば、プロモーターは、そのプロモーターがコードする配列の転写又は発現に作用するため、コード配列に作用可能に結合されている。一般に、作用可能に結合したDNA配列は、連続的であり、2つのタンパク質コーディング領域を連結することが必要であるなら、同じ読み枠内にある。

#### 【0049】

組換え体：組換え核酸は、天然でない配列を有するか、2つの他の分離した配列のセグメントの人工的な組合せにより作られたものである。この人工的な組合せは、しばしば、化学的合成により、又はより一般的には核酸の単離されたセグメントの人工的な操作により、例えば遺伝子工学技術により行われる。

哺乳動物：その用語は、ヒト及び非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語“被検体”は、ヒト及び獣医学の対象を含む。

#### 【0050】

### 2. 動物の抗原特異的免疫応答を増強する組成物及び方法

抗原活性化の最中又は後のCD4T-細胞に対するOX-40レセプター結合

による哺乳動物の抗原特異的免疫応答の増強は様々な方法を利用して成し遂げられうる。選定の方法は主に対応の免疫応答の増強が所望される抗原のタイプに依存し、そして有用な様々な方法を以下に論じる。どの方法を選定しようと、精製OX-40レセプター結合因子は抗原によるT細胞のプライミングの最中又は直後にその動物のT細胞に供与されるようにその動物に投与すべきである。T細胞の活性化は一般に抗原を免疫系に供与してから約3～7日後以内に起こるため、一般にOX-40レセプター結合因子を動物に選定の方法により、抗原に対して動物の免疫系を曝露してから約7日以内に投与するのが好ましい。OX-40レセプター結合因子を抗原と一緒に投与する場合、体内で増強された安定性（即ち、長くなった半減期）を有する剤型で投与することで、抗原プライミングの最中又は後、その因子が循環系内にOX-40と結合するのに十分な時間残留できるようにすることが好都合でありうる。かかる増強した安定性を有するOX-40レセプター結合因子の形状には例えばヒトIgGの定常領域に融合された可溶性OX-40リガンドを含んで成る融合タンパク質が挙げられる。任意の選定のOX-40レセプター結合因子の半減期の決定のため、標準的な方法が利用されうる。例えば、静脈内注射によるかかる因子の投与後、少量の血液サンプルを動物から採取し、次いでそのサンプルを約10日間にわたり6～24時間毎に採取する。その後、各サンプル中に存在する因子の濃度を決定する（例えば、Harlow & Lane, 1988 に記載の標準の免疫定量法、例えばELISA）。この因子の半減期はこの因子の濃度が第一サンプル測定のその50%にまで低下した時点と定義する。

#### 【0051】

ある状況では、例えば抗原が免疫系に長期間供されるような場合（例えば癌患者において）、OX-40レセプター結合因子は免疫系を抗原に曝露してから7日以上経過した後に投与してよい。例えば、患者からの一次腫瘍の外科的除去の後、OX-40レセプター結合因子を投与して転移部にある腫瘍抗原に対する免疫応答を増強させ、これにより身体からのかかる転移部の浄化を促進する。このような状況では、OX-40レセプター結合因子の投与は通常患者の免疫系を腫瘍抗原に対して、一次曝露してから7日以上経過した後に行われるが、にもかか

わらず、それは抗原がT-細胞に供与されるときに存在している。

#### 【0052】

OX-40レセプターに結合する分子は一般にタンパク質、例えば抗-OX-40抗体又はOX-40リガンドであろうが、哺乳動物に投与される調製品は様々な形態をとってよく、例えば精製OX-40レセプター結合因子、OX-40レセプター結合因子をコードする核酸分子、OX-40レセプター結合因子を発現する細胞もしくはウィルス、又はかかる細胞もしくはウィルスに由来する調製品等であってよい。

#### 【0053】

その最も単純な形態において、哺乳動物に投与する調製品はOX-40レセプター結合因子であり、慣用の投与形で投与され、そして好ましくは医薬賦形剤、担体又は希釈剤と組合せる。適当な医薬担体は固体でも液体でもよく、そして緩衝剤、酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、他のポリペプチド又はタンパク質、例えば血清アルブミン、炭水化物、錯形成剤、並びにその他の安定化剤及び賦形剤が挙げられる。適当な固体担体にはラクトース、ステアリン酸マグネシウム、テラアルバ、スクロース、タルク、ステアリン酸、ゼラチン、アガー、ペクチン、アカシア及びココアバターが挙げられる。固体担体の量はどの担体を選定するかに依存して大幅に変わり、但し好ましくは1回の活性剤の投与当り約25mg〜約1gであろう。適当な液体担体には中性緩衝食塩水が挙げられ、任意的に適当な保存剤、安定化剤及び賦形剤が挙げられる。この担体又は希釈剤は更に当業界周知の遅延剤、例えばグリセロールジステアレートを単独で、又はワックスと組合せて含みうる。適当な医薬担体の上記の例は例示にすぎず、そして当業者は多種多様なかかる担体が採用し得ることを認識しているであろう。リポソームベース導入システムもOX-40レセプター結合因子の導入に採用できうる。血流の中に時間をかけて因子を計量放出するために採用されうるリポソームベースシステムは当業界において周知であり、そして米国特許第4,356,167号(Sandoz : LA Kelly ; “Liposome drug delivery systems” )、同5,580,575号(ImaRx : EC Ungerら ; “Therapeutic drug delivery systems” )、同5,595,756号(Inex Pharm and Univ of BC : MB Bally et al, ; “Liposomal compositions f

or enhanced retention of bioactive agents ” ) 及び同5,188,837 号 (Nova Pharm : AJ Domb ; “Lipospheres for controlled delivery of substances ” ) 並びにその引用文献に記載のシステムにより例示される。

#### 【0054】

OX-40レセプター結合因子と医薬担体との製剤はあらゆる物理形態をとってよいが、好ましくは直接注射に適当な無菌液体懸濁物又は溶液とする。好ましくは、患者に上記の製剤でOX-40レセプター結合因子を投与する（即ち、医薬担体との組合せで）。ここでこの製剤は臨床学的に有効な量の因子を含むものとする。

#### 【0055】

本明細書で利用する「臨床学的に有効な量」とは臨床学的に有意義な効果をもたらす量である。この種の効果はOX-40レセプター結合因子の使用される臨床学的背景、例えば当該因子を治療薬として使用するのか（例えば、感染症又は癌の治療）又は予防薬として使用するのか（例えばワクチン）に応じて変わるであろう。治療的背景においては、OX-40レセプター結合因子も癌患者に投与するなら、患者の症状の任意の改善が臨床学的に有意義となることが期待されるであろう。従って、かかる状況では、「臨床学的に有効な量」は癌の少なくとも部分的な退行をもたらすOX-40レセプター結合因子の量、及び癌の更なる進行を遅める又は抑える量を包括する。同様に、当該因子を感染因子、例えばウィルス又は細菌に対する患者の免疫応答を増強するために利用する治療的背景においては、患者がかかる感染因子に既に感染している場合、臨床学的に有効な量とは臨床学的に有意義な効果を、即ち感染症又は臨床学的徴候のある程度の退行をもたらす効果をもたらす量をいう。

#### 【0056】

予防的背景、例えばワクチン化においては、OX-40レセプター結合因子の臨床学的有効量は標的抗原に対する免疫応答の増強を供する、即ち、OX-40レセプター結合因子の投与抜きで示されるものより強い免疫応答を生み出すのに十分な量をいう。ワクチン化により生ずる免疫応答の定量化は任意の標準的な手段、例えば任意の慣用テスト抗原に対する血清抗体力価のレベル及び／もしくは

期間の測定、並びに／又は *in vitro* でのテスト抗原に応答するリンパ増殖の測定により達成されうる。

#### 【0057】

OX-40レセプター結合因子の臨床学的に有効な量は使用する実際のOX-40レセプター結合因子（例えば、それが可溶性OX-40リガンド又は抗-OX-40抗体フラグメントであるか）、臨床学的背景（例えば、その因子を治療的に使用するのか、予防的に使用するのか）、患者の特性（年齢、体重、受けている他の投薬、等）、及び治療的背景、症状の症度に依存して変わるであろう。かくして、臨床学的に有効な用量の評価は最終的には医師、獣医、又はその他の患者をよく知る看護人により決定されるであろう。典型的には、本発明の方法に従う哺乳動物へのOX-40レセプター因子の投与は一回の投与当たり約10ng～1gのOX-40レセプター結合因子の投与を包含し、一般に約10 $\mu$ g～100mgの単独用量単位が利用され、そして1mg又は10mgまでの特別な用量もよく利用される範囲であろう。

#### 【0058】

治療的用途の場合、OX-40レセプター結合因子は患者に様々なルート、例えば静脈内ルートで投与してよく、又は患者が腫瘍を有する場合、腫瘍部位に直接投与してよい。この因子は組成物中の唯一の活性成分であっても、又は有益な効果を有するその他の因子、例えばインターフェロン又はその他の免疫刺激分子と組合わせてもよい。

#### 【0059】

予防的（ワクチン）背景においては、OX-40レセプター結合因子は患者に慣用のワクチン調製品、例えば細菌又はウィルス抗原を含んで成るワクチン調製品と組合せて投与してよい。OX-40レセプター結合因子は慣用のワクチンと組合せてよく、又は慣用のワクチンと共に個別の調製品とに投与してよい。前述の通り、適当なOX-40レセプター結合因子の選別は、この因子が循環系の中で抗原プライミングの間T細胞上のOX-40レセプターに対して結合できるのに十分長く（即ち、抗原を投与してから約3～7日）残ることを確実なものとなるように行う。好ましくは、OX-40レセプター結合因子を別々に投与する

なら、それはワクチンを投与してから1週間以内に投与する。本発明において利用するのに適当な慣用のワクチン調製品は精製細菌抗原、加熱殺菌済み細菌、サブユニットワクチン及び生きた又は弱毒化したウィルスをベースとするウィルスワクチンで調製されたものが挙げられる。

#### 【0060】

OX-40レセプター結合因子を哺乳動物にワクチン抗原を有する単一調製品で投与する場合、この調製品は単に臨床学的に有効な量のOX-40レセプター結合因子を抗原調製品と混合することにより調剤できうる。他方、OX-40レセプター結合因子は抗原と一緒に製造してよい。例えば、ワクチンとして投与する抗原が細菌抗原又はその混合物である場合、その抗原調製品のもととなる細菌はOX-40レセプター結合因子を発現する遺伝子導入細菌であってよい。かかる状況では、OX-40レセプター結合因子は細菌抗原との組合せで直接得られる。同様に、腫瘍抗原及びOX-40レセプター結合因子を含んで成るワクチンはOX-40レセプター結合因子を発現する腫瘍細胞から調製できうる。遺伝子導入原核及び真核細胞内でタンパク質、例えばOX-40リガンドを発現する方法は周知であり、そして標準の実験教科書、例えばSambrookら(1988)に記載されている。

#### 【0061】

その他の態様において、本発明は特定の抗原に対する哺乳動物の免疫応答がOX-40レセプター結合因子をコードする核酸分子を哺乳動物に投与することにより増強し得ることを考慮する。かかる核酸分子は好ましくは細胞内に投与するか、又はウィルスゲノムの一部として投与するが、それは「裸」の核酸分子として直接投与してもよい。例えば、OX-40レセプター結合因子をコードする核酸分子は弱毒化細菌(即ち、哺乳動物に投与したときに有意義な疾患を惹起しない生物形態)にプラスミドベクターで導入し、OX-40レセプター結合因子が細菌の表層上で発現されるようにしてよい。この細菌を哺乳動物に慣用の弱毒化細菌ワクチンと同じようにして投与してよい。他方、OX-40レセプター結合因子をコードする核酸分子は生きた弱毒化ワクチンとして利用されるウィルスのゲノムの中に導入してよい。弱毒化ウィルスには必須遺伝子が欠失しているもの

が挙げられる。米国特許第5,665,362号及び同5,837,261号（Cantab Pharmaceuticals：Inglisら）。この目的のために適当なウイルスにはDNAウイルス、例えばアデノ、ヘルペス、パポバ、パピロマ及びパーボウイルス、並びにRNAウイルス、例えばポリオウイルス及びインフルエンザウイルスが挙げられる。ウイルスワクチンとして使用できる異種核酸配列を担持するウイルスの調製方法は米国特許第5,665,362号及び同5,837,261号（前掲）、同5,338,683号（Health Research：E Paoletti）及び同5,494,807号（E Paoletti）に記載されている。

#### 【0062】

別の態様では、OX-40受容体結合因子をコードする核酸を腫瘍細胞に導入し得る。多くのガン患者で、腫瘍細胞が、例えばMHCのダウンレギュレーション及び／又は補刺激分子発現などの機構を介して免疫系による検出を逃がれている。従って、以前に提唱された一つの治療法は、患者から腫瘍細胞を取り出し、それに、例えばMHCクラスII、補刺激分子B7、及び刺激／接着分子CD2（欧州特許出願EP0733373）をコードする核酸を導入することであった。本発明を、この様な方法に応用して、OX-40受容体結合因子をコードする核酸分子を腫瘍細胞に導入することにより、かなりの利益が期待される。

#### 【0063】

全ての型の腫瘍が、例えば乳房、肺、膵、卵巣、腎、大腸及び膀胱のカルシノーマ、並びにメラノーマ及びサルコーマが、潜在的にはこの方法によって治療され得る。OX-40受容体結合因子をコードする核酸を、腫瘍細胞でOX-40受容体結合因子を発現するために適したベクター内に組込む。適当なベクターには、プラスミド、コスミド及びウイルスベクター、例えばレトロウイルス、アデノウイルス及びヘルペスウイルスがある。欠陥ウイルス、例えば米国特許5,665,362及び5,837,261に記載したものを、この目的のために使用し得る。ウイルスベクターは高効率に哺乳動物細胞に感染するので、他の型のベクターに比べて利点がある。OX-40受容体結合因子をコードする核酸分子に加えて、他の核酸分子を、免疫原効果を更に強めるために、ベクターに組込むこともできる。例として、その様な核酸分子には、MHCクラスIIタンパク質（ $\alpha$



及び $\beta$ サブユニットを含む)、及び他の補刺激分子、例えばB7. 1及びB7. 2がある。希望するなら、選択マーカをコードする核酸分子をベクターに導入してもよく、その結果、ベクターによってうまく形質転換された腫瘍細胞を容易に選択し得る。

#### 【0064】

次にベクターを腫瘍細胞内に、一連の技術、例えばエレクトロポレーション、リポフェクション、ウィルス生産細胞との共培養、又はその他標準的な方法により導入する。好ましい態様では、腫瘍細胞は、治療するために患者から取り出した細胞であり、あるいは、腫瘍細胞株、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手できるヒト腫瘍細胞株に由来する細胞であってもよい。

#### 【0065】

ベクターが導入された細胞を選択するために、細胞選別を行いたい場合、多数の方法により、例えば選択マーカを用いた場合には、その発現を選択し、あるいは、細胞表面上のOX-40受容体結合因子の発現を選択することにより、これを行い得る。後者の方法は、蛍光活性化細胞選別機(FACS)により簡便に行い得る。

#### 【0066】

次にその腫瘍細胞を、適当な担体、例えば緩衝水溶液、食塩水、又はグリシンと共に患者に投与する。好ましい態様では、その腫瘍細胞が元々患者から取り出した場合、患者に投与する前に、それらを弱毒化する。弱毒化した細胞は、代謝上活性があるが、もはや増殖することができないものである。腫瘍細胞を弱毒化する方法が周知であり、例えばEP0733373に記載されている。

#### 【0067】

別の態様では、OX-40受容体結合因子を含有する。腫瘍細胞由来の細胞膜を、完全な腫瘍細胞の代りに患者に投与し得る。標準的な方法、例えばフレンチプレス、凍結融解又は超音波処理によって細胞を破壊又は溶解することにより、細胞膜調製品を容易に調製できる。細胞の破壊後、膜に富む分画を遠心により得ることができる。

#### 【0068】

あるいは、患者の体内でOX-40受容体結合因子を発現させるために、OX-40受容体結合因子をコードする核酸分子を、「裸の」DNAの形で患者に投与し得る。動物の体内で当該DNAを発現させるために、裸のDNAを動物に投与する方法が周知であり、例えば米国特許5,620,896 (Univ Massachusetts Med Ctr : JE Herrmann et al.; "DNA vaccines against rotavirus infections"), 5,643,578 (Univ Massachusetts Med Ctr & St Jude Children's Res Hosp : HL Robinson et al.; "Immunization by inoculation of DNA transcription unit") 及び5,593,972 (Wistar Inst & Univ of PA : DB Weiner et al.; "Genetic immunization") に記載されている。

#### 【0069】

本発明は、ガン等の症状を治療するための他の免疫治療法、例えば養子免疫も含む。当分野で周知の通り、養子免疫とは、特定の抗原に露出されたリンパ細胞を採取し、当細胞の活性が増加する条件下でex vivoで当細胞を培養し、そして当細胞を個体に投与することである。当リンパ細胞は、好ましくは、ガン患者から取り出したT細胞、例えば排出リンパ節からのT細胞である。本発明によると、当細胞上のOX-40受容体とOX-40受容体結合因子とが結合することにより、当細胞が刺激され、そして当細胞から生じる記憶細胞の数が増加するだろう。従って、本発明の1つの点は、患者に当細胞を投与する前に、ex vivoでリンパ細胞を、OX-40受容体結合因子を含有する培地中でインキュベーションするという形の養子免疫である。リンパ細胞の採取、ex vivoでの当細胞と免疫刺激剤とのインキュベーション、及び患者への投与に関する方法の詳細な技術が、当分野に周知であり、例えば米国特許4,690,915 (US DHS : SA Rosenberg ; "Adoptive immunotherapy as a treatment modality in humans"), 5,229,115 (Immunex : DA Lynch ; "Adoptive immunotherapy with interleukin-7"), 5,631,006 (Endotronics : GB Melink et al.; "Immunotherapy protocol of culturing leukocytes in the presence of interleukin-2 in a hollow fiber cartridge"、及び4,902,288 (M Ingram ; "Implantable immunotherapy system using stimulated cells") に記載されている。

#### 【0070】

### 3. 実施例

以下の実施例で、本発明で使用する方法と材料、並びに本発明の効能を説明する。

#### 実施例1：OX-40受容体結合因子による抗原特異的T細胞の刺激

OX-40受容体結合因子が抗原特異的T細胞を刺激することを証明するために、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)特異的T細胞及び、OX-40受容体結合因子としての抗OX-40mAbを用いて、*in vitro* T細胞増殖検査を行った。

##### 【0071】

RPMI/10%FCS中で増殖させた後、MBP特異的T細胞を採集し、洗浄し、計数し、そして培地中に再懸濁し、それをVandenbark et al. (1985)が報告したT細胞増殖検査に用いた。96ウェル平底プレート内で、 $2 \times 10^5$  T細胞を刺激培地中で48時間刺激し、そして18時間 $1 \mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ] -TdRで標識した。細胞を集め、平均チミジン取り込み(cpm)を3ウェルから計算した。ラットCD3、OX-40及びCD28に対するモノクロナル抗体をPharmingen (La Jolla, CA) から購入した。

##### 【0072】

*in vitro*でT細胞増殖に対するOX-40Lの効果を調べるために、96ウェル平底プレート内で $2 \times 10^5$  /ウェルでT細胞をまき、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶性又はプレート結合性抗CD3抗体と共に、種々の濃度の抗OX-40抗体によって刺激した。当細胞を48時間培養し、18時間 [ $^3\text{H}$ ] -チミジンで標識し、その後採集し、そして計数した。図2に示す通り、その結果を、3ウェルから計算したCPM平均値と標準偏差とで表す。その結果から、OX-40受容体結合因子(すなわち抗OX-40mAb)は、用量依存的に、MBP特異的CD4<sup>+</sup> T細胞を補刺激/刺激(分裂促進)したことが示される。

##### 【0073】

#### 実施例2：OX-40受容体結合はエフェクター段階で起こる

OX-40受容体結合が効果を呈するT細胞の発達段階(ナイーブ又はエフェクター細胞)を決定するために、マウスIEk MHCクラスII分子を発現する線

維芽細胞株を用いた (Dubey et al., 1995)。この細胞株は、Kaye and Hedrick (1989) により報告されたT細胞受容体トランスジェニックマウスから得たT細胞に、抗原 (ハトチトクロームC (PCC)) を提示できる。この細胞株を用いて、OX-40リガンドを発現し、且つT細胞受容体トランスジェニックマウスから得た脾臓CD4<sup>+</sup> T細胞を刺激できるトランスジェニック線維芽細胞株を生産した。

#### 【0074】

当該マウスから直接採取したナイーブT細胞を、(1) MHCクラスII単独、(2) MHCクラスII及びB7. 1、(3) MHCクラスII及びOX-40リガンド、又は(4) MHCクラスII、OX-40リガンド及びB7. 1、を発現する線維芽細胞と組み合わせて、PCC抗原によって刺激した効果を比較した実験から、MHCクラスII/OX-40リガンド/B7. 1の組合せが、ナイーブT細胞を最もよく刺激することが示された (データ未記載)。

#### 【0075】

しかる後、当該動物から直接取り出したナイーブT細胞を、PCC抗原と、MHCクラスII及びB7. 1を発現する線維芽細胞とで刺激して、エフェクター細胞を生産した。次にこれらのエフェクター細胞を、IL-2中で5日間増殖させ、洗浄し、そして(1) MHCクラスII単独、(2) MHCクラスII及びB7. 1、又は(3) MHCクラスII及びOX-40リガンド、を発現する線維芽細胞と組み合わせてPCC抗原によって再刺激した。この実験を、APC:T細胞の3つの異なる比率において行い、2回目の刺激の効果を、IL-2生産量の測定から決定した。図3に示す通り、その結果から、MHCクラスII及びOX-40リガンドを発現するAPCによる抗原提示が、エフェクター段階T細胞を最も強力に刺激したことが示された。従って明らかに、OX-40受容体結合は、エフェクターT細胞の段階においてより重要であり、このことは、エフェクター段階にあるCD4<sup>+</sup> T細胞の発達においてOX-40受容体の結合が機能し、そして記憶細胞の発達を促進することを示唆する。このことから、OX-40Lによる補刺激の効果は、ナイーブ細胞に作用してエフェクター細胞に転移させる以前に記載された補刺激分子による補刺激の効果とは明らかに区別される。

## 【0076】

実施例3：OX-40受容体結合因子は腫瘍耐性を誘導する

*in vivo*で腫瘍のプライミング中にT細胞にOX-40受容体結合因子を供与する効果を決定するために、OX-40受容体結合因子として、ヒトIgGのFc部分に連結した可溶性OX-40L（OX-40L：HuFcIgG）を用いて実験を行った。

## 【0077】

この一連の実験のための接種方法として、 $1-3 \times 10^5$  MCA303サルコーマ腫瘍細胞（Huntzicker & Fox, 1995）を、0日目にマウスの皮下に接種した。3日後に、その動物の腹腔内にOX-40L：HuFcIgGを注射し、そして腫瘍接種の7日後に、2回目の投与を行った（投与量は実験に応じて変動した、下記参照）。それから50日間以上、その動物の腫瘍成長を監視した。腫瘍のサイズが $1.94 \text{ cm}^2$  ( $0.3 \text{ in}^2$ ) になった時点で動物を殺した。

## 【0078】

図4は、3日目に確立した腫瘍に対する、腹腔内注射した可溶性OX-40リガンドの顕著な効果を示す。6匹の動物に、インビトロで継代培養した $3 \times 10^5$  MCA303腫瘍細胞を注射した。腫瘍接種後3日目と7日目に、3匹の動物に、可溶性マウスOX-40リガンド $100 \mu\text{g}/500 \mu\text{l}$  RPMIを与え、別の3匹の動物に、 $500 \mu\text{l}$  RPMI単独を与えた。接種後50日間、その動物の腫瘍の徴候を監視した。図4に示す通り、OX-40Lを与えなかった全ての動物は38日以内に死亡したが、OX-40Lを与えた動物では腫瘍がなくなった。

## 【0079】

しかる後、腫瘍のプライミング中に可溶性OX-40リガンドで処置し、且つ腫瘍攻撃に対して耐性となった動物では、抗CD8の腹腔内投与により、CD8<sup>+</sup> T細胞が枯渇した。これらの動物を殺し、脾臓細胞を単離し、その表現型を調べたところ、CD8<sup>+</sup> T細胞は枯渇していた。その脾臓細胞をナীবマウスに養子移入し（1脾臓相当数/マウス）、移転後9日目にその受容マウスをMCA303腫瘍で負荷を与えた。等数のMCA303腫瘍細胞をコントロールのナイ

ープマウスに接種し、そして全ての動物の腫瘍の徴候を、接種後50日間監視した。図5で示す通り、腫瘍細胞のみを与えた全ての動物は、腫瘍細胞の投与後31日以内に死亡したが、腫瘍免疫動物から得た脾臓細胞を移入した動物は、健康のままであった。この実験から、腫瘍細胞と共にOX-40受容体結合因子をマウスに投与した効果により、養子移入後に免疫を付与するために十分な量の腫瘍抗原特異的記憶T細胞が生産されることが示される。従って、エフェクター／記憶細胞転移において、OX-40受容体の結合によりエフェクターT細胞を補刺激することが重要であることが明白である。

#### 【0080】

実施例4：OX-40受容体結合因子は*in vivo*で継代された腫瘍細胞に対する耐性を付与する

実施例3に記載された、OX-40L投与により付与された防御性は、*in vitro*で継代培養された腫瘍細胞に対して示された。*in vivo*で継代された腫瘍細胞は、有意により高い腫瘍性を有するので、OX-40Lが*in vivo*で継代された細胞に対して防御性を付与することができるかどうかを調べた。10匹の動物に、*in vivo*で継代された $1 \times 10^5$  MCA303細胞を皮下注射した。腫瘍接種後3日目と7日目に、5匹の動物に、 $100 \mu\text{g}$ の可溶性OX-40リガンドを腹腔内注射し、別の5匹の動物に同量のRPMIを注射した。腫瘍接種後80日間、その動物の腫瘍の徴候を追跡した。図6で示す通り、その結果から、OX-40Lの投与は、高腫瘍性の*in vivo*で継代された腫瘍細胞に対してさえも、増加した防御性を付与することが示される。

#### 【0081】

異なる投与量のOX-40Lを用いて、*in vivo*で継代された腫瘍細胞に対する防御性を、OX-40Lが付与できるかどうかを調べた。20匹の動物に、 $1 \times 10^5$  個の*in vivo*で継代されたMCA303腫瘍細胞を皮下注射した。その動物を5群に分け、腫瘍接種後3日目と7日目に、種々の量の可溶性OX-40リガンドを腹腔内注射した。コントロール群にはRPMIを与え、一方投与量の変更として、25, 50, 100及び $250 \mu\text{g}$ のOX-40Lの注射を行った。腫瘍接種後60日間、その動物の腫瘍の徴候を追跡した。図7で

示す通り、その結果から、OX-40Lを与えた動物に現れる腫瘍耐性の増加は、OX-40Lの投与量に依存すること、そして悪性の*in vitro*で継代された腫瘍細胞に対してさえ、より多い投与量のOX-40受容体結合因子により、50%生存が達成され得る。

#### 【0082】

実施例5：腫瘍ワクチンの成分としてのOX-40受容体結合因子

この実施例で、腫瘍ワクチン中でのOX-40受容体結合因子の効能を証明する。MHCクラスII又はOX-40リガンドを発現しないB16-メラノーママウス細胞株F10に、OX-40リガンド及びCIITAのcDNAをトランスフェクション（リポフェクチンによる）した。CIITAのcDNAは、MHCクラスIIプロモーターに結合し、そして内因性MHCクラスII遺伝子の合成及び細胞表層での発現を促進するタンパク質をコードする。これらの2つの遺伝子を、親株F10に共トランスフェクションし、そして3つの変種を単離した：1) MHCクラスII<sup>+</sup>、2) OX-40リガンド<sup>+</sup>、及び3) MHCクラスII<sup>+</sup> 且つOX-40リガンド<sup>+</sup>。これらの変種及び親株に、500ラドの放射線を照射し、そしてそれを（ $2 \times 10^6$  細胞/注射）、ナイーブ動物に皮下注射し、さらに14日後にこのワクチン接種を繰り返した。免疫化された動物に、負荷のために、F10親細胞株（ $5 \times 10^5$  /動物）を皮下注射した。

#### 【0083】

図8は、ナイーブ動物に、放射線照射した親F10腫瘍、ヒグロマイシン耐性のF10腫瘍、MHCクラスIIのみを発現したF10、又は、MHCクラスII及びOX-40リガンドを発現したF10を注射した実験の結果を示す。2週間後に、それらの動物を、生きた親F10腫瘍で負荷し、そして84日間、その動物の腫瘍の徴候を追跡した。図8に示す通り、初期免疫接種しなかった動物は、F10腫瘍細胞によって急速に死亡したが、放射線照射したF10腫瘍による初期免疫接種により、ある程度の防御性が付与された。放射線照射したMHCクラスIIを発現したF10細胞により動物を免疫化した場合、より大きな防御が認められ、MHCクラスII及びOX-40Lの両方を発現したF10細胞により免疫化した場合に、最大の防御が観察された。MHCクラスIIを発現しないF10細胞

では、T細胞受容体との相互作用能が大きく損われるだろうから、この様な結果は予想された。多くの腫瘍細胞ではMHCクラスIIの発現がダウンレギュレーションされるか、又は完全に失われる。従って、臨床上の適用では、患者から取り出した腫瘍細胞を、MHCクラスII及びOX-40受容体結合因子をコードする核酸分子によって形質転換してから、その細胞を患者に戻すことが有益であろう。

#### 【0084】

##### 実施例6-9

以下の実施例では、エフェクターT細胞に補刺激シグナルを伝えるために、OX-40受容体(OX-40R)に、OX-40リガンド(OX-40L)又は抗体アゴニストを結合させた。これは、腫瘍特異的T細胞の応答を促進するために行われた。*in vivo*で腫瘍のプライミング中にOX-40L:Ig又は抗OX-40Rを注射することにより、4つの別個の組織に由来する4つの異なる腫瘍において、ある割合で(20-55%)腫瘍が消失した生存個体が生じた。抗OX-40Rの効果は用量依存的であり、そして腫瘍特異的T細胞の記憶を強化した。これらの実施例のデータから、*in vivo*においてOX-40Rの結合は、宿主の天然種の腫瘍特異的T細胞を刺激/増殖することによって、腫瘍特異的なプライミングを増加させることが示されるであろう。*in vivo*においてヒト腫瘍細胞周辺に集塊形成したOX-40<sup>+</sup>T細胞の出現は、腫瘍反応性T細胞を増殖させ、よってガン患者における腫瘍の免疫治療を促進するための実用的なアプローチであることも示されるであろう。

#### 【0085】

##### 実施例6：ヒト乳ガンにおけるOX-40Rの発現

OX-40R<sup>+</sup>T細胞と腫瘍細胞との空間的關係を決定するために、免疫組織化学により、いくつかのヒト乳ガンの生検試料を調べた。原発性腫瘍及び腫瘍により侵襲されたリンパ節の両方において、CD4<sup>+</sup>及びOX-40R<sup>+</sup>細胞を分析した。図9は、浸潤性の延性乳房カルシノーマを有する別個の2人の患者からの典型的な試料を示す。パネルAは、1°腫瘍内での腫瘍に浸潤したリンパ球を図示し、一方パネルBは、腫瘍により侵襲されたリンパ節を図示する。パネルA



は、CD4<sup>+</sup> 細胞が、手術標本の外縁の周りで腫瘍に浸潤していることを示す。OX-40R<sup>+</sup> 細胞を（より高倍率で）視覚観察したところ、それは、腫瘍細胞の極近傍にある侵襲したリンパ球の一群であった。OX-40R<sup>+</sup> 細胞の多数は明らかにより大きく（芽球）、いくつかは有分裂しているリンパ球の外観を示す。パネルBは、その構造の半分以上が腫瘍により侵襲されたリンパ節を図示する。侵襲した腫瘍の周りに多数のCD4<sup>+</sup> 細胞が存在する。侵襲した腫瘍に隣接する領域に、OX-40R<sup>+</sup> 細胞が集積していた。また、腫瘍が侵襲していない領域にもOX-40R<sup>+</sup> 細胞が認められたが、腫瘍の浸潤部位の最も近傍での割合が最も高かった。これらの組織切片内のOX-40R<sup>+</sup> 細胞が、腫瘍特異的T細胞である可能性が最も高いと考えられる。

#### 【0086】

実施例7：in vivoでの腫瘍プライミング（サルコーマ）中のOX-40R結合

理論に束縛されることを望まない場合、腫瘍部位又は排出性リンパ節でのOX-40R<sup>+</sup> 細胞が、in vivoで腫瘍特異的T細胞である可能性が最も高いと考えられる。OX-40Rの結合が、強力な補刺激応答を引き起こし、T細胞の増殖、サイトカイン生産の増加、及びエフェクターT細胞の生存促進に至ると考えられる。図10は、in vivoでの腫瘍プライミング中のOX-40Rの結合が、抗腫瘍特異的応答の増加を誘導するかどうかを調べた検査の結果を示す。図10では、致死性移植体であるMCA303（メチルーコラントレン誘導サルコーマ）を皮下注射し、その3日後及び7日後に、mOX-40L：Ig，OR3：1g、又は塩水で処理したマウスを示す。DR3：1gで処理したマウスは、塩水を与えたマウスと同様のキネテックスで腫瘍が成長したので、死亡した。対照的に、mOX-40L：Igを与えたマウスでは、全ての腫瘍の成長が遅れ、その内60%は70日間以上腫瘍が消失した。mOX-40L：Igで防御されたマウスを再度MCA303の皮下注射で攻撃したところ、そのマウスは腫瘍が消失したままであった。このことは、そのマウスで、腫瘍特異的記憶T細胞応答が展開したことを示すと考えられる。

#### 【0087】

次に、MCA303を注射したマウスに、腫瘍接種後3日目と7日目に、種々の用量のmOX-40L:Igを与えた。25又は50 $\mu$ gのmOX-40L:Igを与えたマウスは、塩水処理したコントロールマウスと同様な時間経過で腫瘍が成長したので、死亡した。100 $\mu$ gのmOX-40L:Igを与えたマウスの50%で、腫瘍の成長が遅れ、250 $\mu$ gを与えたマウスの100%で、腫瘍の成長が遅れた。最後には、100 $\mu$ g群の25%及び250 $\mu$ g群の50%で、腫瘍攻撃後70日間以上腫瘍が消失した。MCA303腫瘍細胞株は、*in vivo*で継代した回数が多くなるに連れて、腫瘍性がより高く、そして免疫原性がより低くなることに注意すべきであろう。図11では、MCA303腫瘍細胞株は、図10の場合よりも多い回数継代されたので、OX-40L:Ig処理は、100 $\mu$ g用量では、少しより小さな程度の効果を示したと考えられる。

#### 【0088】

図12は、*in vitro*で継代されたMCA303を接種してから、mOX-40L:Igで処理したマウスの生存経過を示す(*in vitro*で継代したMCA303は、処理が容易である)。マウスに、腫瘍を皮下接種し、そして腫瘍接種後3日目及び6日目に、mOX-40L:Igを注射した。パネル4Aは、mOX-40L:Igで処理した全てのマウスが、最初の腫瘍攻撃から生存したが、塩水注射した全てのマウスは、腫瘍の負荷のために死亡した。次に、最初の腫瘍攻撃から生存したmOX-40L:Ig処理マウスを、MCA303で再度攻撃したところ、全てのマウスが、53日間、2回目の攻撃から免れた(データ未表示)。次に、これらの同一マウスにMCA303を皮下接種し、10日後に、抗Ly t-2を腹腔内注射することによりCD8細胞を除いた。3日後に、これらのマウスを殺し、その脾臓内にCD8細胞がないことが示された。そしてこれらの脾臓細胞 $1.45 \times 10^7$ 個を、ナイーブマウスに移入した。15日後に、そのマウスをMCA303の皮下注射により攻撃した。図12Bは、CD8細胞欠失した免疫細胞を与えたマウスは、腫瘍攻撃に耐性であったが、コントロールマウスは、腫瘍の負荷により死亡した。

#### 【0089】

実施例8：弱免疫原性腫瘍モデル(B16/F10)におけるOX-40R特異

## 的治療

B16/B16メラノーマ株のF10変種を、放射線照射したワクチンとして皮下注射した場合、それは、防御性の免疫応答を惹起しないことから、免疫原性の弱い腫瘍として評価された。図13は、腫瘍のプライミング中のOX-40Rの結合が、その攻撃的な腫瘍に対する免疫性を増加させるかどうかを決定するための試験の結果を示す。図13Aは、F10の接種後3日目及び7日目にmOX-40L:Igでマウスを処理したことは、コントロールマウスに比べて有効であったことを示す（約25%が腫瘍攻撃から長期間生存した）。図13Bは、同じ投与量で供給された、OX40Rに結合する別個の薬剤（モノクローナル抗体OX-86）が、mOX-40L:Igの場合と同レベルまで腫瘍が欠失した生存数を増加したことを示す。当抗体処理による腫瘍欠失マウスの割合は、OX-40L:Igによる場合と非常に同等であった。ログランク分析から、両試薬は、統計的に有意に腫瘍防御性を付与することが示された（ $p=.007$ （Ab）及び、 $0.5$ （mOX-40L:Ig））。

## 【0090】

### 実施例9：結腸直腸ガンモデル（CT26）における抗腫瘍免疫の増強

同様の方法で、前記通りに皮下注射により、CT26腫瘍細胞を有するマウスを処理した（mOX-40L:Ig；2回投与様式）。HuOX-40L:IgはマウスOX-40Rに結合しないので、それをネガティブコントロールとして用いた。最初の実験では、2回投与により、腫瘍欠失生存を有意に（ $p=.04$ ）増強することができた（データ未表示）。次に、腫瘍接種後複数回注射すること以外は前記と同様の実験を行った（2, 7, 14, 21, 27及び40日目に注射した）。図14Aは、複数回の注射は、2回注射よりも、より高い有意性（ $p=.01$ ）で腫瘍欠失した生存に有益であった。次に、mOX-40L:Igで処理した中から生存した7匹のマウスを、CT26で再度攻撃した。図14Bは、その全てのmOX-40L:Igマウスが攻撃に耐性を示し、そして腫瘍欠失したままであったが、ナীবコントロールマウスの全ては、腫瘍攻撃により死亡した。次に、その7匹の腫瘍欠失マウスを、異なる組織に由来する同系の腫瘍（Reuca；腎由来）で攻撃して、腫瘍特異的な応答を検査した。CT26

耐性マウス7匹中6匹が、R e u c a腫瘍による負荷のために死亡した。このことから、C T 2 6耐性マウスは、大腸ガンに伴う腫瘍抗原に特異性を示すことが示されると考えられる。

### 【0091】

実施例6-9の要約：腫瘍のプライミング中のOX-40Rの結合

表1に、実施例6-9に示した通り、4つの腫瘍モデルにおいて腫瘍のプライミング中にOX-40Rを結合させた場合のデータを要約した。このデータから、免疫原性がより高い腫瘍ほど、治療に対してより大きく反応することが示唆されるが、それでもなお、免疫原性の貧しいメラノーマモデル(F10)においてもある程度の治療結果が認められた。前記の図には、SM1乳ガン株以外の全ての腫瘍株に関するデータが示されている。SM1を注射し、その接種後3日目及び7日目にOX-40L:1gを注射したマウスでは、腫瘍欠失した生存個体の増加から示される通り、抗腫瘍活性が増加した。そのSM1のデータをログランク(log-rank)統計分析にかけ、それが $p=0.01$ で有意であることが示された。

### 【0092】

表1：

例6-9：腫瘍プライミングの際のOX-40R結合のまとめ

腫瘍起源	免疫原性	処理	腫瘍なし/注射を施したマウス
MCA303	中	mOX-40L:1g	9/16
(肉腫)		食塩水又はDR3:1g	0/16
CT26	中	mOX-40L:1g	9/24
(大腸癌)		hOX-40L:1g	2/24
SM1	弱	mOX-40L:1g	7/28
(乳癌)		食塩水	1/28
B16/F10	微弱	mOX-40L:1g	5/20
(黒色腫)		食塩水	0/20
		抗OX-40R	5/25
		ラットIg	0/25

## 【0093】

腫瘍プライミングの際の *in vivo* でのOX-40Rの結合はいくつかの腫瘍モデルにおいて顕著な治療的利点を示すことが信じられる。この効果は用量依存性であり、そしてマウスにおいて持続性腫瘍特異的免疫を構築し、マウスは初期腫瘍負荷から治療した。EAEにおける炎症損傷内のOX-40R<sup>+</sup>細胞が自己抗原に応答するT細胞であることを示すその他のデータは、ここに記載の実験がOX-40R特異的治療による腫瘍-Ag特異的細胞を標的とすることを示唆している。*in vitro*でのOX-40Rの結合はT細胞サイトカインの生産、増殖及び生存を高める強力な補刺激現象を及ぼすことが示される。従って、腫瘍プライミングの際のOX-40Rの結合は腫瘍フリー生存に結びつく腫瘍-Ag特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の増殖及び機能を増強するものと信じられている。乳癌生検中の腫瘍細胞に隣接するOX-40R<sup>+</sup>T細胞の出現はこれらの発見が似たような治療的効果を有するヒト臨床試験に適用できることを示唆する。

## 【0094】

腫瘍プライミングの際のOX-40Rの *in vivo* 結合は4種類の組織タイプから隆起した4種類の固形腫瘍における腫瘍フリーマウスの比率に結びつく。このデータはOX-40Rベース治療が一般に免疫系を腫瘍免疫に限らず増強できるだけでなく、あらゆるタイプのワクチン（ウイルス、細菌、等）のための免疫アジュバントとしても利用できることを示唆する。OX-40R特異的免疫増強は、*in vivo*で導入されたOX-40Rに対する抗体が自己免疫疾患を一層悪化し、そして慢性型のGVHDを急性GVHDに転換させてしまうことを示しながら説明されてきた。

## 【0095】

huOX-40L:Ig融合タンパク質がヒト臨床試験において利用でき、且つヒトT細胞を *in vitro*で刺激できる本発明に適用可能なタンパク質の例であると信じられている。抗体及び可溶性OX-40L融合タンパク質はここに記載の腫瘍モデルにおいて似たような効能をもって機能しうが（図13、そして他のデータは示していない）、この抗体はもしそれが免疫原性が弱く、且つ *in vivo*で長い半減期を有するものとなったなら、将来においていく

つかの長所を有しうるようになる可能性があるものとなりうる。

#### 【0096】

抗体、例えば抗-4-1BB又は抗-CTLA4による腫瘍免疫の増強は、誘導又は阻止されたときに腫瘍特異的免疫を増強するT細胞活性化抗原の他の例である。OX-40Rと同様に、4-1BBレセプターはTNF-レセプター科の構成員であり、且つ強い補刺激特性を有するT細胞活性化抗原として発表されている。4-1BBレセプターはCD8及びCD4T細胞並びにNK細胞上で発現される。4-1BBレセプター補刺激機能は主にCD8<sup>+</sup>T細胞に対して有効であるようであり、そして腫瘍プライミングの際のこのレセプターの結合は腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞溶解機能の50倍の上昇及び増大した腫瘍細胞生存率へと結びつく。CTLA-4タンパク質はCD8及びCD4T細胞の双方で発現され、そしてそのリガンド(B7.1又はB7.2)と結合すると、T細胞に対してダウンレギュレーションシグナルを送る。CTLA-4/B7相互作用を阻害する抗体はAg-特異的T細胞機能を増強し、そして最終的に腫瘍特異的免疫を増強しうる。OX-40R特異的治療はそれ自体有効であるが、100%の腫瘍フリーマウスには結びつかず、それ故抗-CTLA4又は抗-4-1BBと本発明に係る抗-OX-40R結合との組合せが、Ag-特異的T細胞治療を強化する本発明の好都合な態様を供しうる。他方、腫瘍特異的T細胞療法は、CD4及びCD8 Ag-特異的エフェクター/記憶T細胞応答の双方の増強を担いとして、腫瘍プライミングの際に2種以上のこれらの抗体を組合せてよい。

#### 【0097】

Ag-特異的プライミングの際のOX-40Rの*in vivo*結合はAg-特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の数及び寿命を増大させるものと信じられている(データは示さない)。ほとんどのT細胞はエフェクターT細胞段階においてAgと遭遇してから活性化誘導細胞死(AICD)に対して感受性となりはじめ、そしてそのわずかし記憶T細胞とならなかった。腫瘍プライミングの際のOX-40Rへの結合は腫瘍反応性CD4<sup>+</sup>T細胞を標的とし、そしてそれらをAICDから助ける。Ag-特異的細胞の数の増大はマウスを腫瘍フリーにし続け、そして第二腫瘍負荷に対して戦うようにする。図11BはOX-40R処理腫瘍免

疫マウスがCD8 枯渇脾臓細胞の養子移入を介して抗腫瘍免疫を授けうることを示す。このデータは腫瘍-Ag 特異的記憶CD4<sup>+</sup> T細胞の増加及び／又は増強があり、そしてそれらが養子防御力を移入できることを示唆する。CD4<sup>+</sup> T細胞は腫瘍と相互作用する最終エフェクター細胞ではないことがあり、なぜなら4つのモデル全てにおいて、腫瘍細胞はMHCクラスIIを発現できないからである。にもかかわらず、腫瘍Ag-特異的CD4<sup>+</sup> T細胞による増強したサイトカイン生産は、その後腫瘍と直接相互作用して腫瘍を破壊するようになるCD8<sup>+</sup> T細胞、NK細胞及びマクロファージの活性化を助けることにより有効でありうる。

#### 【0098】

OX-40Rは癌及び自己免疫疾患における炎症部位から単離されたCD4<sup>+</sup> T細胞上でのみ発現し、そしてかなり迅速に代謝回転するものと信じられている(24~48hr以内)。しかしながら、CD4及びCD8 T細胞の双方は*in vitro*でConA又はPHAで刺激されるOX-40Rを発現できることが示された。T細胞上でOX-40R発現をアップレギュレーションする唯一の方法はTCR結合を介するものであると認められる。高度な炎症状況、例えば超Ag刺激でさえも、Ag非特異的細胞上でのOX-40Rの間接的(bystander)なアップレギュレーションはないものと認められる。超抗原SEAの注射されたマウスでは、OX-40Rはこの超Agの標的TCRであるVベーター3/CD4<sup>+</sup> T細胞上でのみ発現される。従って、*in vivo*での腫瘍プライミングの際のOX-40Rへの結合はAg活性化されたばかりのT細胞を標的とする。

#### 【0099】

超Ag刺激及びEAEの臨床徴候に関する炎症はTh1サイトカインの生産に関与することが示された。Th1系へのOX-40Rの結合はIL-2の転写及び翻訳のアップレギュレーションによりT細胞増殖を増強でき、そしてエフェクターT細胞はナイーブT細胞よりもOX-40R特異的補刺激に対して一層感受性であると認められた。分化してTh1又はTh2サイトカインのいずれかを産生するに至ったエフェクターT細胞は共にOX-40R-特異的補刺激

に対して感受性である。Th2エフェクター細胞に対するOX-40Rの結合はIL-4及びIL-5の翻訳及び分泌を増大させ、そしてその増殖を増強する。2つの報告は最近OX-40Rの結合が細胞をTh2表現型に局在化させうることを示した。我々のデータはT細胞局在化が、分化の際のT細胞の周囲環境に依存し、そしてOX-40Rの結合がTh1又はTh2応答の双方を増強することを示唆した。抗腫瘍Th2免疫応答は腫瘍の撲滅には結びつかないが、I型応答は結びつく。従って、腫瘍プライミング（IL-12, IFN-ガンマー及び/又は抗IL-4による）の際にTh1応答を増強することが、*in vivo*でOX-40Rと結合する試薬を投与したときに最適な抗腫瘍免疫応答を得るために好都合であると期待される。

#### 【0100】

OX-40Lは活性化された抗原提示細胞、例えばB細胞、樹状細胞、内皮細胞及びマクロファージ上でのみ発現される。OX-40Lの*in vivo*発現は高度な炎症状況、例えばMMTV（排出性LN）によるマウスの感染症又は炎症器官（脳）から単離されたマクロファージ上にEAEを有するマウスにおいて起こると認められる。正常な一次T細胞応答、例えばCFAにおけるAgによる免疫でさえも、OX-40L発現は脾臓マクロファージ上でかなり低かった。OX-40RはT細胞がTCRを通じて誘導されると常に発現され、従って有能なOX-40R補刺激効果はAPCに対するOX-40Lのアクセス不能さにより調節されうる。免疫系は発展して免疫応答を構築し、外来物質を迅速に浄化し、次いでそれ自身容易にダウンレギュレーションする。OX-40L媒介補刺激はエフェクターT細胞段階でかなり強いため、それは多大な侵入が起こり、持続炎症に至ったときにのみ必要でありうる。アグレッシブな腫瘍は免疫抑制メカニズムを介して免疫応答をダウンレギュレーションし、従って腫瘍部位付近のAPCはおそらくはOX-40Lを発現しないであろう。腫瘍特異的免疫応答は上記の実験において、*in vivo*でOX-40Rに結合するシグナルを添加することで増強し、それ故腫瘍負荷マウスの大部分が腫瘍フリーであり続けることができるものと信じられている。

#### 【0101】



まとめると、上記の例6～9において、腫瘍プライミングの際のOX-40Rの結合は、コントロール処置マウスと比べ、腫瘍の出現を遅らせ、且つ阻止するのに有効であると信じられる。OX-40R効果は用量依存性であり、そして様々な免疫原性及び非免疫原性腫瘍モデルにおいて観察された。OX-40R発現は様々なヒト癌（黒色腫、頭及び首、並びに乳癌（図9参照））の腫瘍部位に局在したT細胞上で認められた。OX-40R<sup>+</sup> T細胞と1°腫瘍及びリンパ節に侵入した腫瘍の双方における乳癌細胞との物理的な関係の検討は、OX-40R<sup>+</sup> T細胞が腫瘍を囲む領域において濃厚であることを示唆し、そしてそれらは腫瘍特異的T細胞であると信じられている。マウス腫瘍モデルにおけるOX-40R治療データと腫瘍担持患者におけるOX-40R<sup>+</sup> の出現との組合せは、免疫腫瘍反応性が、癌を有する患者のOX-40Rと結合するようにデザインされた試薬により増強されることを示唆するものと信じられる。このデータは特に例えばAg-特異的プライミングの際のOX-40Rの結合が多種多様ワクチン製剤の有用なアジュバントでありうることを示唆するものと信じる。

#### 【0102】

以上は本発明の限定でない例示であり、本発明の請求の範囲を逸脱することなく様々に改良、変更されることが当業者に明らかである。

#### 【0103】

##### 【表1】

## 参考文献：

- Better et al. (1989) Methods in Enzymology 178: 476-496.
- Better and Horowitz (1990) Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Immune Disease & the Immune Response (ICSU Short Reports), (Strailein et al., eds.) vol. 10:105.
- Calderhead et al. (1993) J. Immunol. 151: 5261-5271.
- Dubey et al. (1995) J. Immunol. 155: 45.
- Glockshuber et al. (1990) Biochemistry 29: 1362-1367.
- Godfrey et al. (1994) J. Exp. Med. 180: 757-762.
- Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (ISBN 0-87969-314-2).
- Huntzicker et al. (1995) 9th International Congress of Immunology, San Francisco, Abstract #5170:872.
- Kaye and Hedrick (1989) Nature 341:746
- Krummel et al. (1996) J. Exp. Med. 183: 2533.
- Latza et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 677-683.
- Lenschow et al. (1996) Ann. Rev. Immunol. 14: 233.
- Mallett et al. (1990) EMBO J. 9: 1063-1068.
- Miura et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11: 1313-1325.
- Paterson et al. (1987) Mol. Immunol. 24: 1281-1290.
- Sambrook et al. (1989). In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York.
- Vandenbark et al. (1995) J. Immunol. 135: 223.
- Vetto et al. (1997) Am. J. Surg. 174: 258-265.
- Wakunas et al. (1996) J. Exp. Med. 183: 2541-2550.
- Weinberg et al. (1996) Nature Medicine 2: 183-189.
- Weinberg et al. (1994) J. Immunol. 152: 4712-4721.

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

免疫系CD4T細胞活性化及び応答の提唱のメカニズムの模式図。

## 【図2】

in vitroでのT細胞増殖に対するOX-40レセプターの結合の効果を示すグラフ。

## 【図3】

MHCクラスIIのみ、MHCクラスII+B7. 1又はMHCクラスII+OX-40リガンドのいずれかを発現するAPCで再刺激したT細胞により生産され

るIL-2のレベルの対比を示すグラフ。

【図4】

腫瘍細胞の接種されたマウスに対するOX-40レセプター結合因子の投与の保護効果を示すグラフ。

【図5】

OX-40レセプター結合因子及び腫瘍細胞の接種されたマウスからの脾臓細胞の、腫瘍細胞によりその後負荷されたナイーブマウスへの養子移入の保護効果を示すグラフ。

【図6】

*in vivo*継代した腫瘍細胞の接種されたマウスへのOX-40レセプター結合因子の投与の保護効果を示すグラフ。

【図7】

*in vivo*継代された腫瘍細胞に対するOX-40レセプター結合因子の保護効果が投与するOX-40レセプター結合因子の用量に依存することを示すグラフ。

【図8】

OX-40レセプター結合因子及びMHCクラスIIを発現する照射腫瘍マウスによるマウスの種痘の保護効果を示すグラフ。

【図9】

本明細書に記載の方法による乳癌の処置に関連する。リンパ球及びOX-40 R<sup>+</sup>細胞の局在化を示す染色による2人の患者の由来のかかる癌生検の顕微鏡写真。

【図10】

例6～9の実験における動物の生存率を示すグラフ。

【図11】

例6～9の実験における動物の生存率を示すグラフ。

【図12】

例6～9の実験における動物の生存率を示すグラフ。

【図13】

例6～9の実験における動物の生存率を示すグラフ。

【図14】

例6～9の実験における動物の生存率を示すグラフ。

【図1】

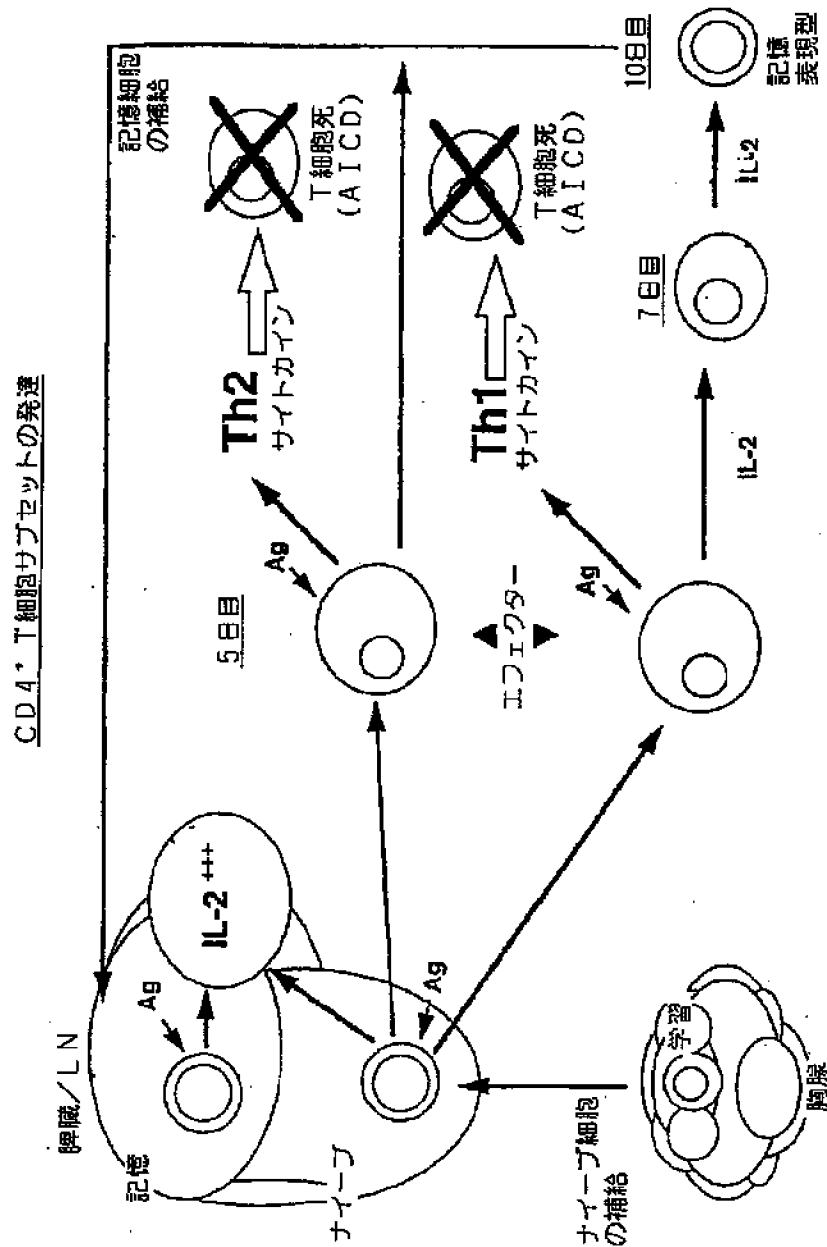


FIG. 1

【図2】

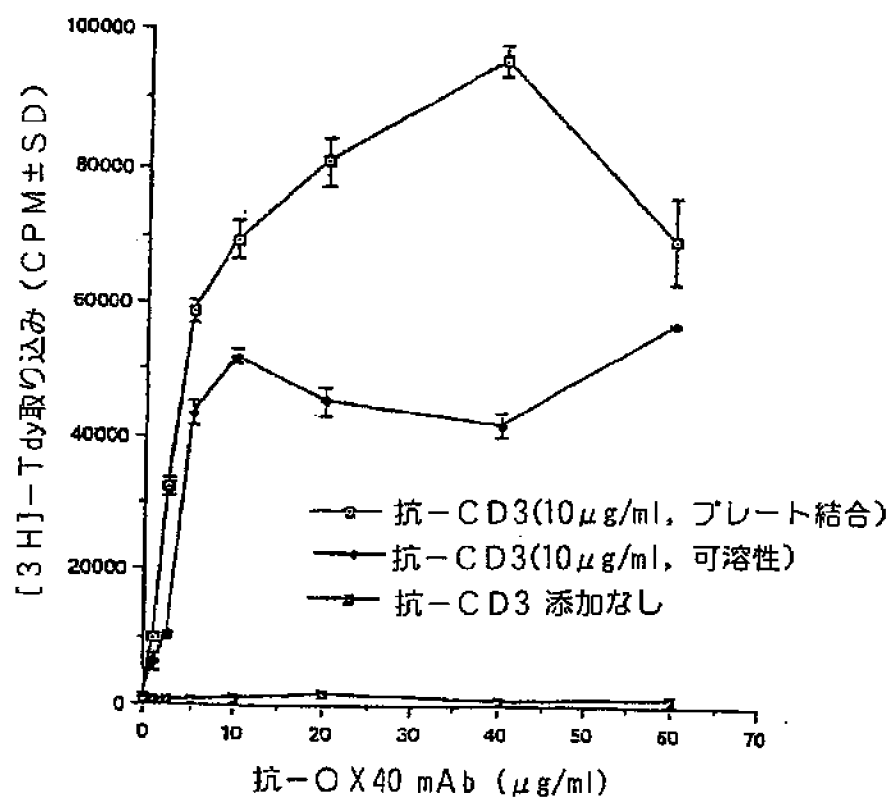


FIG. 2

【図3】

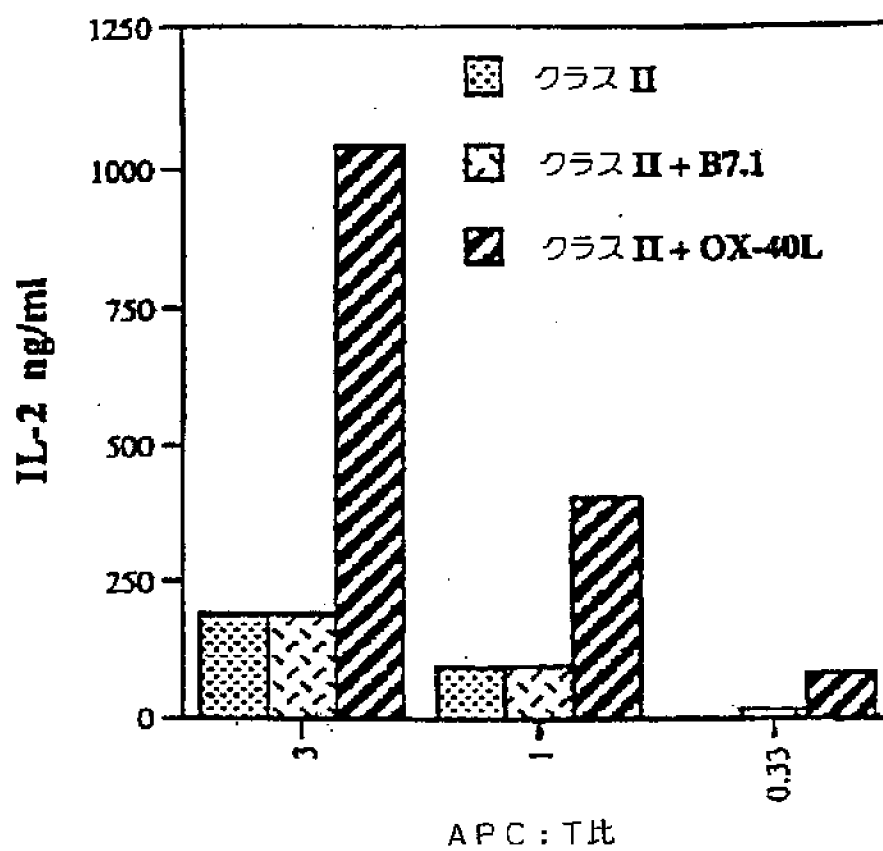


FIG. 3

【図4】

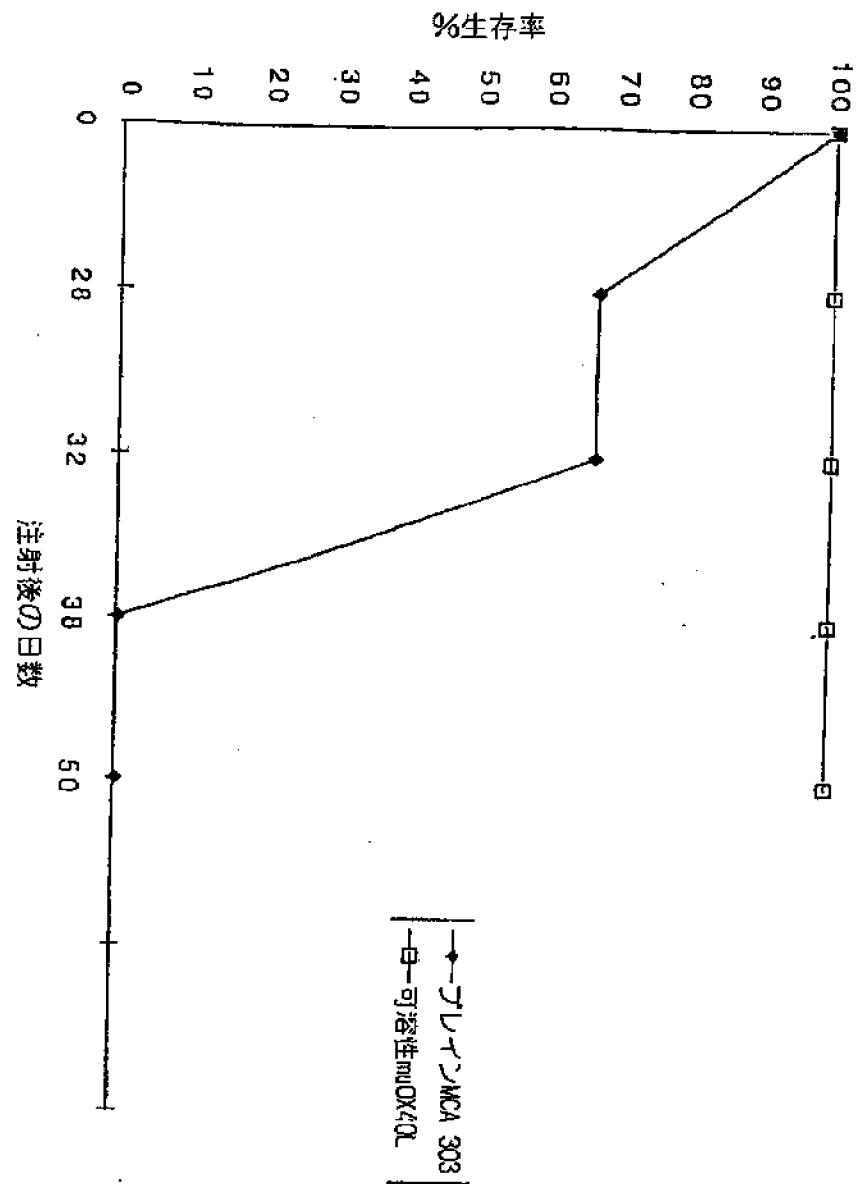


FIG. 4

【図5】

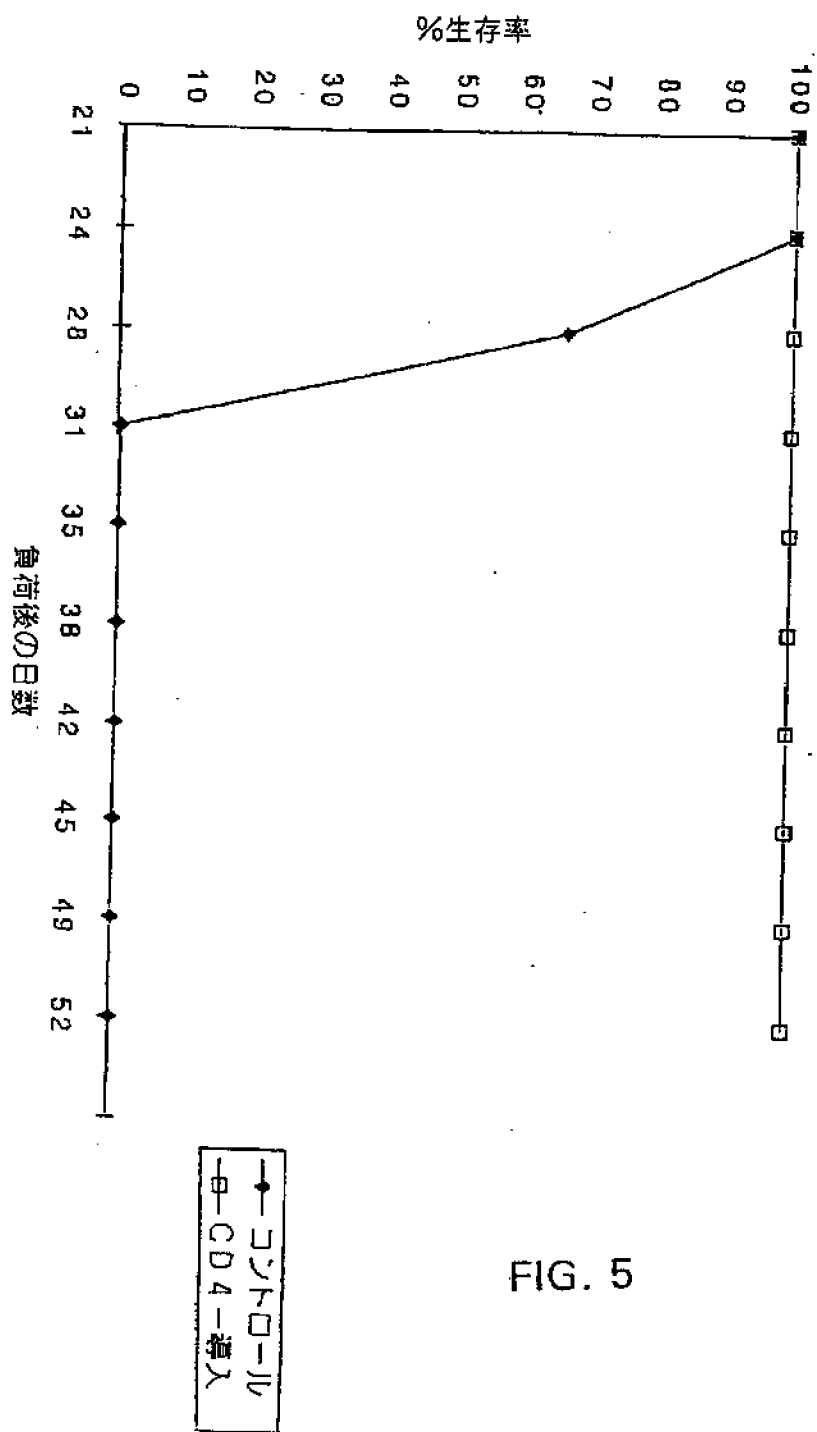


FIG. 5



【図6】

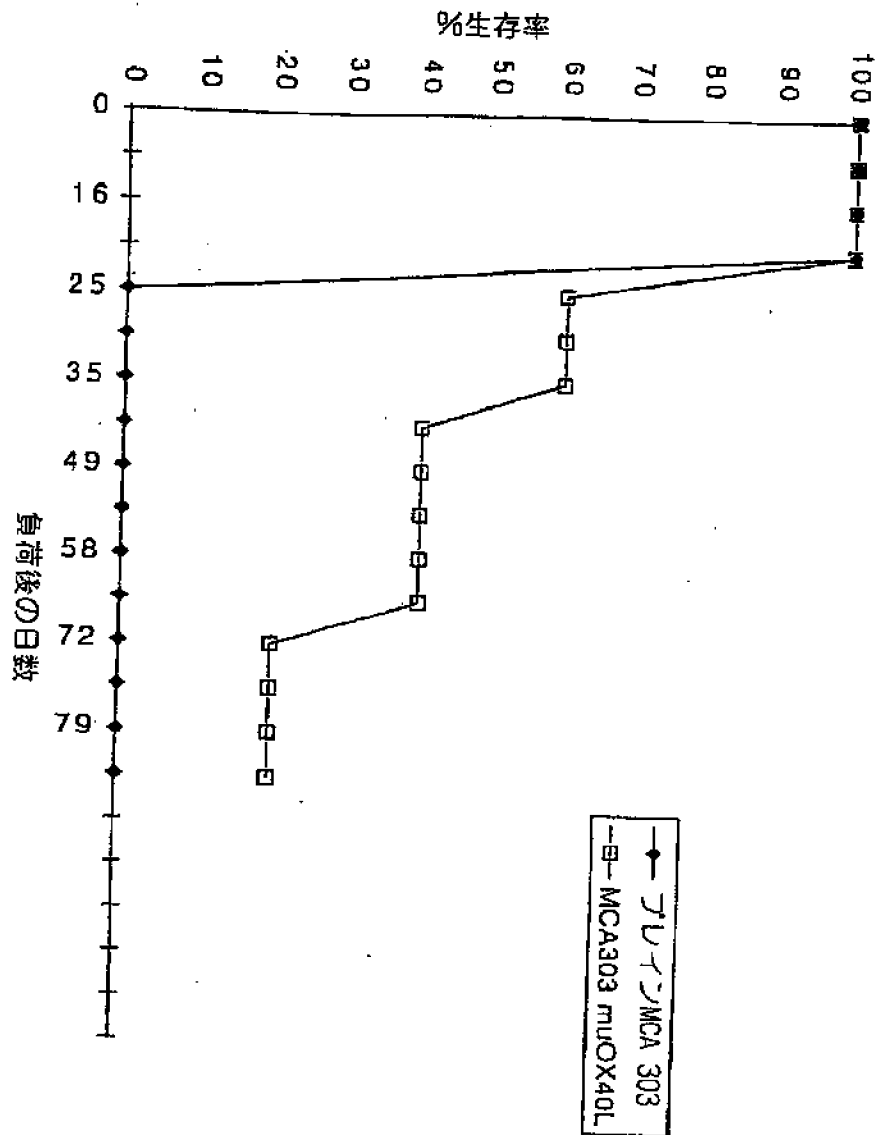


FIG. 6

【図7】

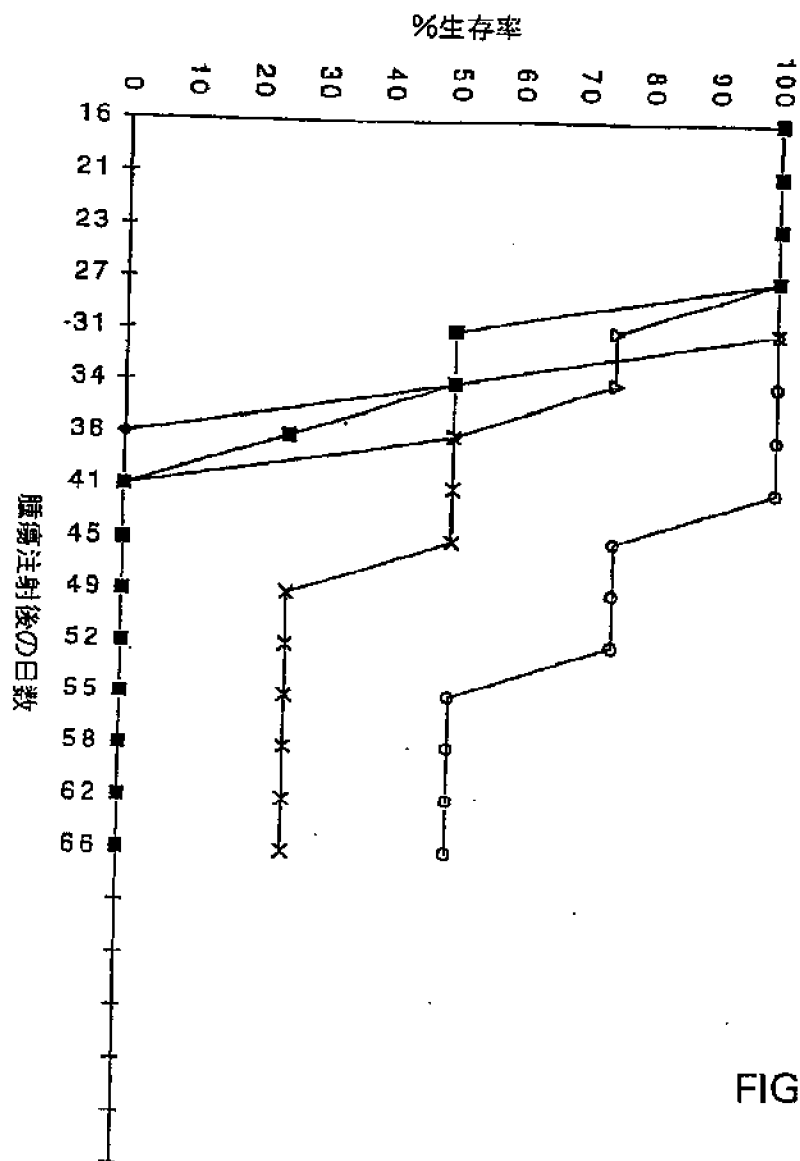
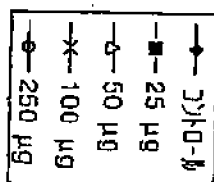


FIG. 7



【図8】

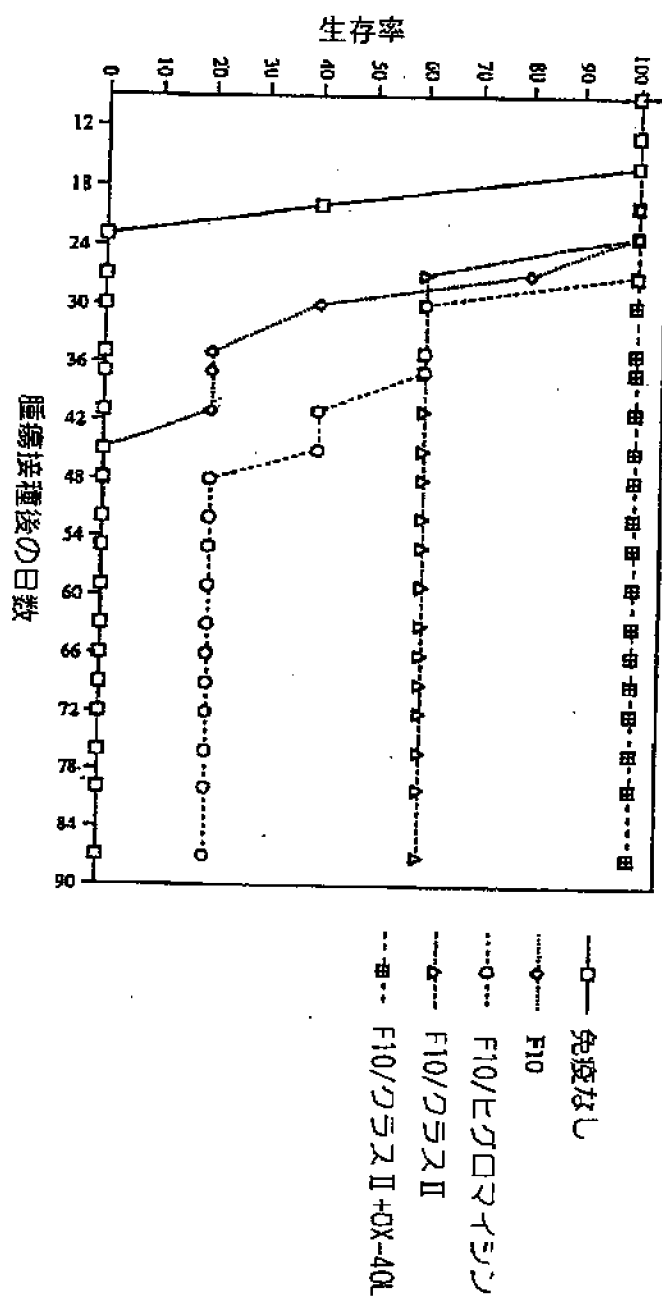


FIG. 8

【図9】

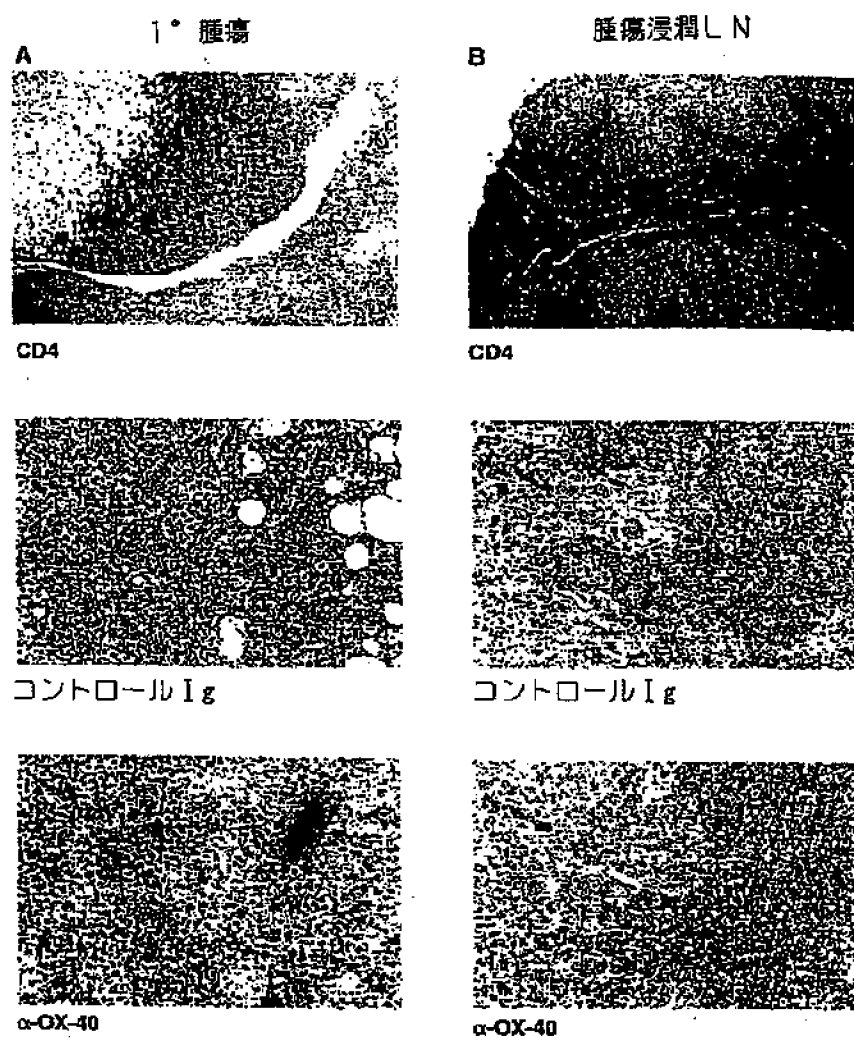


FIG. 9

【図10】

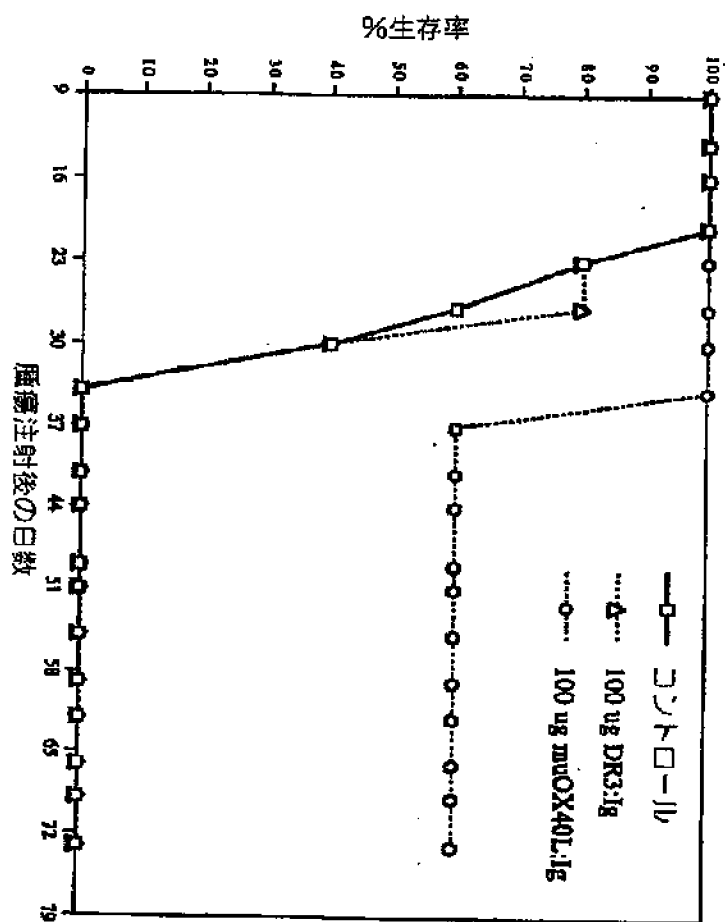


FIG. 10

【図11】

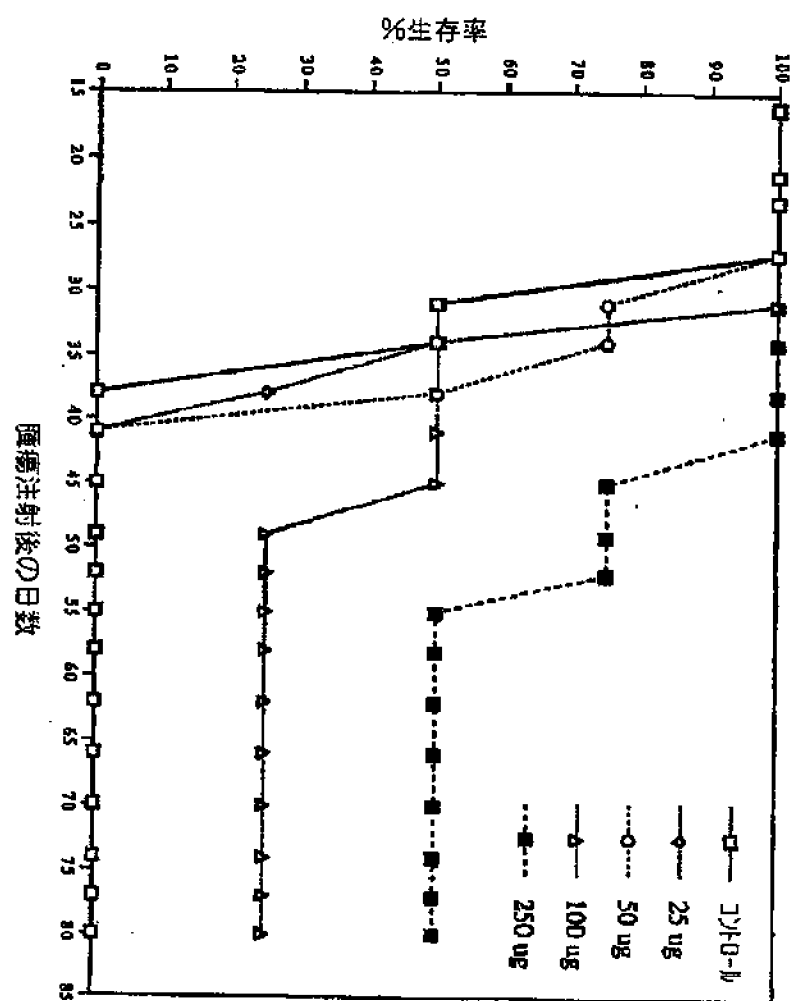


FIG. 11

【図12】

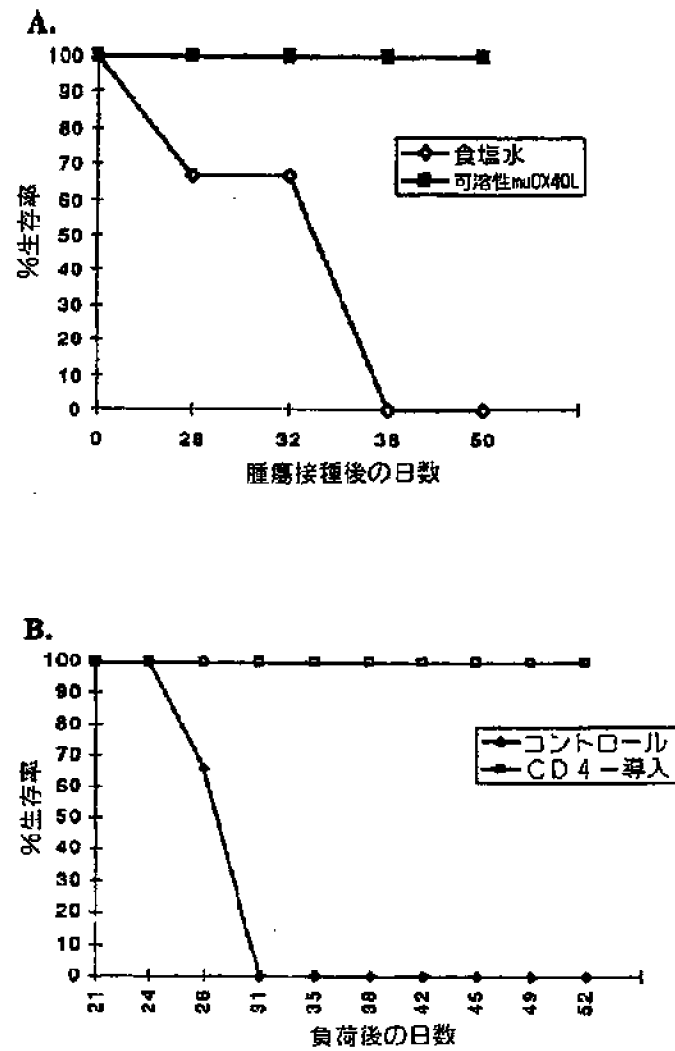


FIG. 12

【図13】

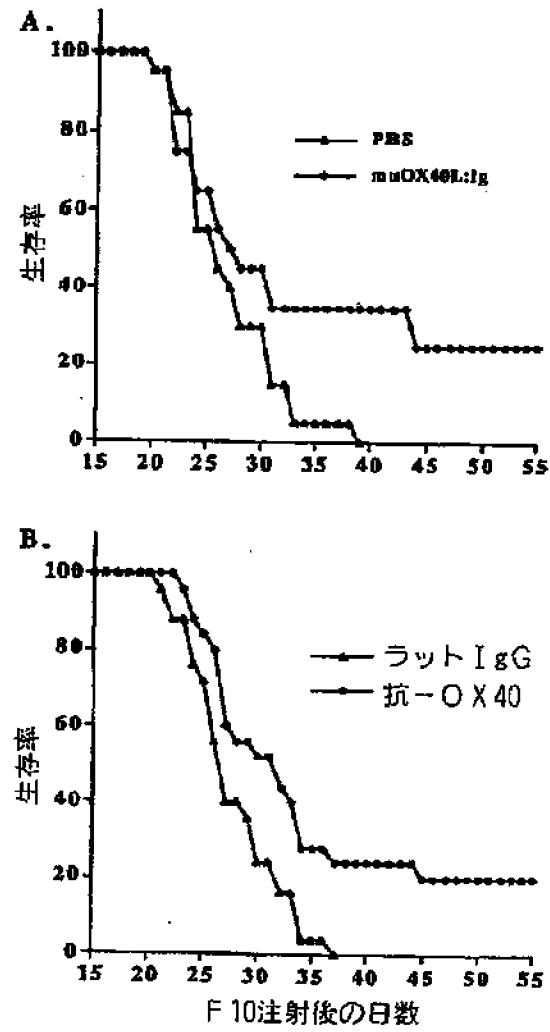


FIG. 13



【図14】

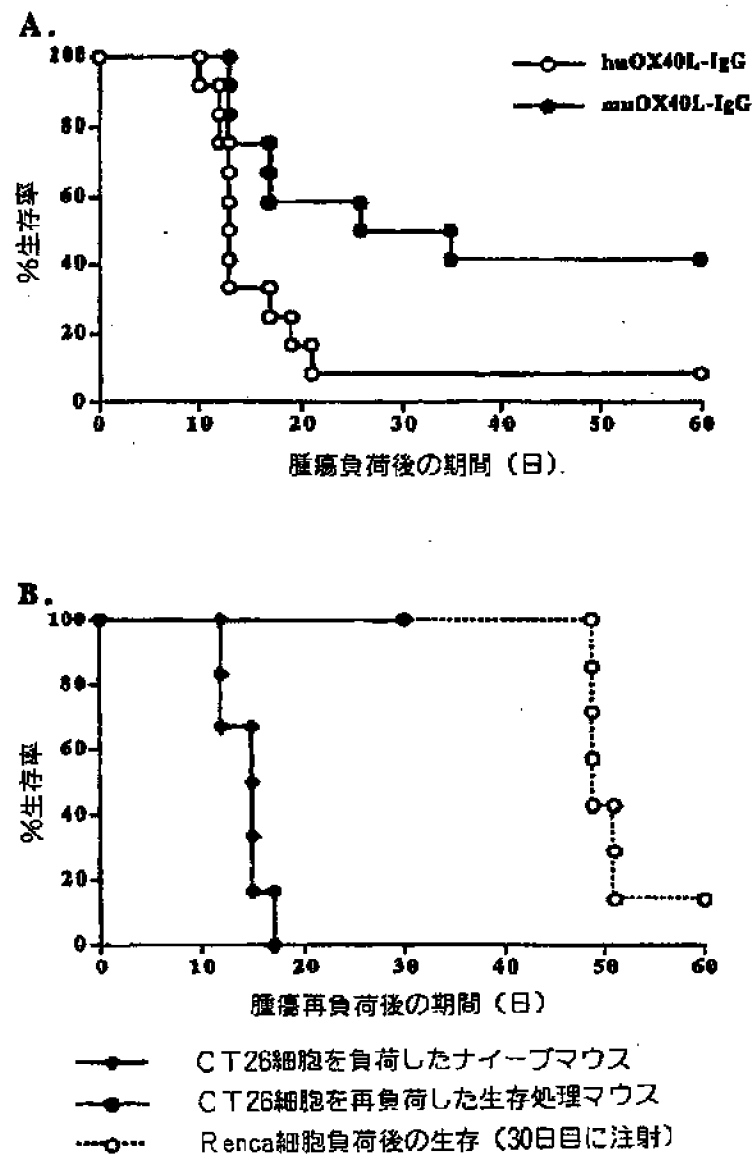


FIG. 14

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/12 A61K39/395 A61K38/16 A61K45/00		International Application No. PCT/US 99/03908
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORRIS, A. (1) ET AL: "Successful transfection of the O <sub>x</sub> - 40 ligand in murine and human tumor cell lines." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (1997) VOL. 38, NO. 0, PP. 401. MEETING INFO.: EIGHTY-EIGHTH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA APRIL 12-16, 1997 ISSN: XP002109413 see the whole document --- -/--	25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document members of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 July 1999		Date of mailing of the international search report 04/08/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5518 Patentstr. 2 NL - 2200 LM Rijswijk Tel. (+31-70) 940-9040, Te. 31 851 89001 Fax: (+31-70) 340-9018		Authorized officer Mennessier, T

Form PCT/ISA/210 (Second sheet) July 1999

page 1 of 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
PCT/US 99/03908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	VEITO J T ET AL: "Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma and head and neck cancers." AMERICAN JOURNAL OF SURGERY, (1997 SEP) 174 (3) 258-65. JOURNAL CODE: 324. ISSN: 0002-9610., XP002109414 United States cited in the application see page 264, left-hand column	25
Y	see page 263 - page 264, left-hand column	1-26
A	WEINBERG A D: "Antibodies to OX - 40 (CD134) can identify and eliminat autoreactive T cells: implications for human autoimmune disease." MOLECULAR MEDICINE TODAY, (1998 FEB) 4 (2) 76-83. REF: 37 JOURNAL CODE: CMK. ISSN: 1357-4310., XP002109415 ENGLAND: United Kingdom see page 81, right-hand column - page 82, left-hand column	1-26
P,X	WEINBERG A D ET AL: "OX - 40: 11fe beyond the effector T cell stage." SEMINARS IN IMMUNOLOGY, (1998 DEC) 10 (6) 471-80. REF: 31 JOURNAL CODE: A61. ISSN: 1044-5323., XP002109416 United States see page 471, left-hand column see page 477 - page 479, left-hand column	1-26
P,X	MORRIS. A. (1) ET AL: "Breast cancer immunity in mice treated with the OX - 40 ligand." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (MARCH, 1998) VOL. 39, PP. 531. MEETING INFO.: 89TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH NEW ORLEANS, LOUISIANA, USA MARCH 28-APRIL 1, 1998 AMERICAN, XP002109417 see the whole document	1-26

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 99/03908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, Y	GRAMAGLIA I ET AL: "Ox - 40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1998 DEC 15) 161 (12) 6510-7. JOURNAL CODE: IFB, ISSN: 0022-1767., XP002109418 United States see page 6510 - page 6511, left-hand column see page 6514, right-hand column - page 6516	1-26

2

Form PCT/ISA210 (continuation of Form PCT/ISA July 1992)

page 3 of 3

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
A 6 1 P 35/00		C 0 7 K 14/705	
37/04		16/28	
// C 0 7 K 14/705		C 1 2 N 15/00	C
16/28		A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, UZ, VN, YU, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA21 BA22 BA44 BA63  
CA04 DA02 DA03 EA02 GA03  
HA01 HA17  
4C084 AA01 AA13 BA35 CA01 CA17  
CA25 DC50 NA14 ZB012  
ZB112 ZB262  
4C085 AA03 BA02 BA51 CC03 DD62  
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40  
DA01 DA15 DA50 DA76 EA28  
FA74